

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

THEMA:

**„METASTASEN BEI UNBEKANNTEN PRIMÄRTUMOR - VORSCHLAG
EINES STATISTISCHEN VERFAHRENS ZUR IMMUNHISTOCHEMISCHEN
DIFFERENZIERUNG HÄUFIGER ADENOKARZINOME “**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Irena Klassen
aus Nowosibirsk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Guski
2. Prof. Dr. med. H. Lobeck
3. Prof. Dr. med. P. Stosiek

Datum der Promotion: 09.12.2002

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 Allgemeines zum Metastasierungsverhalten von Tumoren	7
1.2 Metastasen eines unbekannten Primärtumors (CUP-Syndrom) im Schrifttum	10
1.3 Die Bedeutung der Immunhistochemie für die Differenzierung von Metastasen eines unbekannten Primärtumors	15
2 AUFGABENSTELLUNG	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Immunhistochemie	18
3.1.1 Histologisches Untersuchungsmaterial	18
3.1.2 Allgemeine methodische Aspekte	19
3.1.3 Untersuchte Tumormarker	21
3.1.4 Verwendete primäre Antikörper	26
3.1.5 Ablauf der immunhistochemischen Detektion	26
3.1.6 Interpretation der Gewebsreaktion	27
3.2 Verfahren zur Klassifikation von Tumormarkerspektren	28
3.2.1 Einordnung des Klassifikationsverfahrens	28
3.2.2 Klassifikationsprinzip	29
3.2.3 Programm zur Klassifikation von Tumormarkerspektren	32
3.3 Erfassung klinisch-epidemiologischer Daten zur Vorhersagewahrscheinlichkeit des Primärtumors beim CUP-Syndrom	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Immunhistochemische Färbeergebnisse	37
4.2 Differenzierung von Primärtumoren auf der Grundlage von Tumormarkerspektren	37
4.2.1 Differenzierung von Mammakarzinommetastasen	38
4.2.2 Differenzierung von Ovarialkarzinommetastasen	40
4.2.3 Differenzierung von Kolonkarzinommetastasen	41
4.2.4 Differenzierung von Magenkarzinommetastasen	42
4.2.5 Differenzierung von Pankreaskarzinommetastasen	43
4.2.6 Differenzierung von Nierenkarzinommetastasen	44
4.2.7 Differenzierung von Lungenkarzinommetastasen	45
4.2.8 Zusammenfassende Darstellung der mit hoher Wahrscheinlichkeit abgrenzbaren Metastasen	47
4.2.9 Vorhersagewahrscheinlichkeit für einen Primärtumor bei eingeschränkter Organauswahl	48

4.3	Validität der untersuchten Tumormarker	52
4.3.1	GCDFP-15	52
4.3.2	Estrogenrezeptor	54
4.3.3	Vimentin	54
4.3.4	CEA	55
4.3.5	Cytokeratin 20	56
4.3.6	Cytokeratin 7	57
4.3.7	Surfactant A	57
4.4	Zur Möglichkeit der Vorhersage des Primärtumors beim CUP-Syndrom auf der Grundlage klinisch-epidemiologischer Daten	58
4.4.1	Mögliche Einflußfaktoren auf die Primärtumorwahrscheinlichkeit beim CUP-Syndrom	58
4.4.2	Das Metastasierungsverhalten beim CUP-Syndrom	59
5	DISKUSSION	63
5.1	Diskussion der Aufgabenstellung	63
5.2	Diskussion der Ergebnisse	65
5.2.1	Immunhistochemische Ergebnisse	65
5.2.2	Differenzierungsmöglichkeiten der untersuchten Metastasen	66
5.3	Diskussion der Methodik	71
5.3.1	Möglichkeiten und Grenzen des vorgestellten statistischen Verfahrens	71
5.3.2	Zur Möglichkeit der statistischen Verwendung klinisch- epidemiologischer Daten zum Metastasierungsverhalten und zur Inzidenz von Adenokarzinomen	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	75
	LITERATURVERZEICHNIS	77
	ANHANG	83
	Danksagung	83
	Lebenslauf	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACUP	Adenokarzinom mit unbekanntem Primärtumor	adenocarcinoma of unknown primary
AFP	Alpha-Fetoprotein	
CEA	Karzinoembryonales Antigen	carcinoembryonic antigen
CK7	Zytokeratin 7	cytokeratin 7
CK20	Zytokeratin 20	cytokeratin 20
CLA	Leukozytenantigen	common leucocyte antigen
CUP	Karzinom mit unbekanntem Primärtumor	carcinoma of unknown primary
ER	Östrogenrezeptor	estrogen receptor
G1	Differenzierungsgrad 1: gut differenziert	Grading 1
G2	Differenzierungsgrad 2: mäßig differenziert	Grading 2
G3	Differenzierungsgrad 3: schlecht differenziert	Grading 3
GCDFP		gross cystic fluid protein
LSAB	Immunhistologische Färbemethode mit Streptavidin-Biotin-markierten Antikörpern	Labelled-Streptavidin-Biotin (method)
NSE	Neuronenspezifische Enolase	neuron-specific enolase
PAP	Prostata-saure Phosphatase	prostatic acid phosphatase
PBS	Phosphat-Puffer	phosphate buffered saline
PSA	Prostata-spezifisches Antigen	prostatic-specific antigen
TBS	Tris-Puffer	tris bufferd saline

1 Einleitung

Es stellt im klinischen Alltag keine Seltenheit dar, wenn Patienten ein mitunter fortgeschrittenes metastasierendes Tumorleiden bei unbekanntem Primärtumor aufweisen. Literaturangaben zufolge macht diese sehr heterogene Patientengruppe einen Anteil zwischen 2% [MUIR 1995] und 5-10% [GRECO, HAINSWORTH 1993] aller Krebspatienten aus. Das bedeutet, dass bei diesen Patienten trotz *angemessener* Diagnostik unter Ausnutzung der heute zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren der Primärtumor nicht identifiziert werden kann. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang häufig der Begriff CUP-Syndrom verwendet (Carcinoma of unknown primary) oder ACUP, wenn es sich um ein metastasierendes *Adenokarzinom* mit unbekanntem Primärtumor handelt. Es gibt verschiedene Definitionen dieses sehr heterogenen Krankheitsbildes. Manche Autoren beschränken den Begriff des unbekannten Primärtumors auf solche Fälle, die auch autoptisch nicht aufgeklärt werden können [HOLMES 1970]. Andere wiederum sprechen von einem unbekannten Primärtumor, wenn Anamnese, körperliche Untersuchung und Röntgen-Thorax keinen entsprechenden Hinweis erbringen [STEWART et al. 1979]. Im allgemeinen gehen die meisten Autoren von einem CUP-Syndrom aus, wenn eine histologisch gesicherte Metastase vorliegt und der Primärtumor trotz angemessener diagnostischer Maßnahmen unentdeckt bleibt, und zwar in einem Zeitraum, in dem eine therapeutische Entscheidung erforderlich ist. Damit sind Fälle eingeschlossen, bei denen der Primärtumor im weiteren klinischen Verlauf oder autoptisch schließlich doch bestimmt werden kann [ALTMAN, CADMAN 1986].

MUIR berichtete 1994, dass von über 1 Million über den ICD-Schlüssel in die SEER-Statistik eingegangener Krebsfälle (SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Registries) ein Anteil von etwa 2 bis 3% mit unbekanntem Primärtumor existierte. Dabei zeigte sich im Beobachtungszeitraum von 15 Jahren zwischen 1973 und 1987 insgesamt ein leichter Rückgang dieses Anteils. Zugleich wurde jedoch deutlich, dass trotz aller diagnostischen Fortschritte im Laufe der letzten Jahrzehnte ein relativ konstanter Anteil sekundärer Tumoren verbleibt, die bezüglich ihres Ursprungs nicht identifiziert werden können. Hier liegt nun die besondere Herausforderung für den Pathologen, zur Aufklärung dieses Problems beizutragen. Insbesondere der sich rasch entwickelnden Immunhistochemie kommt dabei eine große Bedeutung zu. Im Hinblick auf mögliche therapeutische Konsequenzen muß es natürlich zuallererst darum gehen, Tumoren zu differenzieren, bei denen potentiell die Möglichkeit einer palliativen oder sogar kurativen Therapie besteht.

1.1 ALLGEMEINES ZUM METASTASIERUNGSVERHALTEN VON TUMOREN

Die Fähigkeit zur Metastasierung ist eine ganz wesentliche Eigenschaft eines malignen Tumors und für die Prognose des betroffenen Patienten entscheidend.

Die Metastasierung läßt sich in mehrere Teilschritte gliedern:

1. Ablösung von Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors,
2. Verschleppung der abgelösten Tumorzellen auf den anatomisch vorgegebenen Bahnen der Lymph- und Blutgefäße,
3. Absiedlung der verschleppten Tumorzellen in regionären Lymphknoten oder in entfernten Organen,
4. Vermehrung der verschleppten Krebszellen zum klinisch manifesten Tumorknoten.

[SCHMAEHL 1982]

Ausgehend von einem soliden Tumor können täglich Millionen maligner Zellen in den Blutstrom gelangen. Trotzdem entsteht nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Metastasen. Es handelt sich also um einen selektiven Prozeß. Daraus ist gefolgert worden, dass maligne Tumoren aus Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlicher Metastasierungstendenz bestehen [FIDLER et al., 1977, 1978, 1980]. Aber auch in den ersten Metastasenorten, die wiederum zu Streuherden werden können, finden Selektionsprozesse statt, so dass die Metastasierung auch als ein sequentieller Prozeß zu sehen ist.

Metastasen können histomorphologisch dem Primärtumor entsprechen. Häufig sind sie jedoch weniger differenziert und stärker proliferierend [SCHMITZ-MOORMANN et al., 1995]. Beispielsweise hat eine immunhistochemische Untersuchung des Estrogen-Rezeptorstatus von Mamma-Karzinomen und ihrer Lymphknotenmetastasen gezeigt, dass dieser in etwa 20% der Fälle nicht übereinstimmt. Im Falle einer Diskordanz hatten die Metastasen ganz überwiegend einen negativen Rezeptorstatus im Gegensatz zum Primärtumor [NEDERGAARD et al. 1995].

Die Metastasen verschiedener Malignome bevorzugen insbesondere als Erstlokalisierung bestimmte Organe. Die typischen Metastasierungsmuster von Tumoren sind in zahlreichen und groß angelegten Autopsiestudien dokumentiert worden [ABRAMS et al. 1950; WILLIS 1973].

Die Metastasierungsrichtung eines malignen Tumors hängt ganz wesentlich von den anatomischen Strukturen ab, die ihn umgeben. Man kann demnach die folgenden Metastasierungswege unterscheiden:

- lymphogene Metastasierung

Bei den meisten Karzinomen (weniger typisch bei Sarkomen) entstehen die ersten Metastasen in den regionären Lymphknoten, oder es kommt bereits in den Lymphgefäßen zu einer Tumorzellhaftung (Lymphangiosis carcinomatosa). Die Lymphknoten sind als Drainagestellen die Prädispositionsstellen für eine Tumorzellhaftung mit anschließender Metastasenbildung. Verschleppte Tumorzellen können jedoch auch die Lymphknoten passieren, um in entferntere Lymphknotenstationen bzw. ins venöse System zu gelangen.

- Implantationsmetastasen in Körperhöhlen

Wenn bei tiefer Tumordinfiltration die Serosa durchbrochen wird, können Tumorzellen in Körperhöhlen, wie z.B. Pleura- oder Bauchhöhle, eindringen und hier metastasieren. Eine Peritonealkarzinose wird besonders häufig von Ovarialtumoren verursacht, die ja zum größten Teil von Serosa bedeckt sind.

- Hämatogene Metastasierung

Im Verlauf des invasiven Wachstums eines Tumors können Blutgefäße arrodieren, die eine Verbreitung von Tumorzellen über den Blutstrom begünstigen. Zum anderen können Tumorzellen auch nach vorheriger lymphogener Ausbreitung schließlich in den Blutkreislauf gelangen. In der terminalen Strombahn bieten sich besonders günstige Bedingungen für eine Tumorzellhaftung und Metastasenbildung.

Die zuletzt genannte hämatogene Metastasierung ist für die Entstehung von Fernmetastasen verantwortlich und wird daher für das CUP-Syndrom besonders interessant. Je nach Lokalisation des ersten Gefäßeinbruchs wurden die wesentlichen Typen der hämatogenen Metastasierung bereits in den 40er Jahren von WALTHER beschrieben worden [WALTHER 1948]. Ergänzend berichtete BATSON 1940 bzw. 1942 über die Bedeutung des vertebralen Venensystems für die Möglichkeit einer primären Skelettmetastasierung bei Prostata- bzw. auch z.T. bei Mammakarzinomen. Somit kann man die folgenden Arten der hämatogenen Metastasierung unterscheiden:

- Arterieller Typ oder Lungentyp

Hierbei führen Primärtumoren der Lunge zu einem lokalen Tumorzelleinbruch in die Lungenvenen, so dass über die weitere Passage der linken Herzhöhlen eine Ausbreitung der Tumorzellen über das arterielle System erfolgen kann. Auf diese Weise entstehen Metastasen im Gehirn, der Leber, den Nebennieren, im Skelettsystem usw.

Natürlich können auch von anderen Primärtumoren stammende Lungenmetastasen zum Ausgangspunkt von weiteren Metastasen werden, die dann ebenso auf arteriellem Wege entstehen.

- Hohlvenentyp

Primärtumoren aus dem Einstromgebiet der Vena cava inferior oder superior können zu einer Tumorzellverschleppung über die rechten Herzhöhlen und die Pulmonalarterie in die Lunge führen. Dieser Metastasierungstyp hat vor allem Bedeutung für Karzinome der Leber, der Niere oder der Schilddrüse.

- Pfortadertyp

Primärtumoren aus dem Bereich der Pfortaderzuflüsse führen zu einer Metastasierung in die Leber. Hier findet man am häufigsten und oft zuerst Metastasen ausgehend von Kolon- und oberen Rektumkarzinomen, von Pankreas- und Magenkarzinomen. Aus der Leber kann eine weitere Streuung über die Vena cava in die Lunge und schließlich ins arterielle System erfolgen.

- Vertebrale Venentyp

Das weitverzweigte vertebrale Venensystem ist durch zahlreiche Anastomosen gekennzeichnet, z.B. zu den pelvinen Venenplexus oder den Interkostalvenen. Bedingt durch thorakale oder abdominelle Druckschwankungen kann es hier zu einer zeitweisen Strömungsumkehr kommen. Auf diesem Wege verschleppte Tumorzellen können Skelettmetastasen verursachen (Wirbelsäule, Becken, Femurkopf). Als Beispiel sei die hohe primäre Metastasierungsfrequenz ins Skelettsystem beim Prostatakarzinom genannt.

- Lymph-Venenweg

Bei zunächst lymphogener Tumorzellverschleppung können über die Cisterna chyli und den Ductus thoracicus maligne Zellen in den linken Venenwinkel gelangen. Auf weiterhin hämatogenem Wege über die Vena cava und das rechte Herz kann es so zur Ausbildung von Lungenmetastasen kommen.

Aus den genannten Metastasierungswegen ergibt sich die besondere Rolle von Lunge, Leber und Skelettsystem als Metastasenorte. Die besonders häufigen Lungenmetastasen werden dadurch erklärt, dass sämtliche Primärtumoren im Einstromgebiet der Vena cava inferior und superior in die Lunge metastasieren, ebenso diejenigen, die zunächst über den Lymphweg streuen, um dann Anschluß an das venöse System zu bekommen. Die Häufigkeit von Lebermetastasen wird beeinflusst durch die hohe Inzidenz der Kolon-/Rektumkarzinome und der übrigen Tumoren der Oberbauchorgane, die alle im Einstrombereich der Pfortader liegen. Zum anderen können die ebenfalls häufigen Lungenkarzinome über den arteriellen Weg in die Leber metastasieren. Skelettmetastasen entstehen ebenfalls auf zwei verschiedenen Wegen über die arterielle Streuung und über die vertebrealen Venen [HOLZNER 1989].

Neben dem Einfluß der Lokalisation des Primärtumors mit den entsprechenden anatomischen Gegebenheiten muß es jedoch noch weitere wesentliche Einflußfaktoren auf das Metastasierungsverhalten von Tumoren geben. Anders wäre nicht zu erklären, weshalb beispielsweise beim Lungenkarzinom bei gleicher Lokalisation und gleichen

Abflußwegen in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp verschiedene Metastasierungsmuster vorgefunden werden [BARZ u. BARZ 1982]. Besonders deutlich wird dies im Hinblick auf die überproportionale Häufigkeit von Lebermetastasen beim kleinzelligen Bronchialkarzinom und den häufigen Erstbefall der Nieren beim Plattenepithelkarzinom der Lunge. Bei zirkumskripten Magenkarzinomen, d.h. mit umschriebenem ulcerösem oder polypösem Herd, steht die hämatogene Lebermetastasierung im Vordergrund. Im Unterschied hierzu findet sich beim diffusen Magenkarzinom nur eine minimale Rate an Lebermetastasen [EDER 1984]. Eine allein hämodynamisch begründete Metastasierung würde auch im Widerspruch zu der Tatsache stehen, daß Organe wie das Herz, die Milz oder die Skelettmuskulatur so unverhältnismäßig selten Metastasen aufweisen, trotz der ausgesprochen hohen Durchblutung.

Tumoren metastasieren also nicht immer in das erste Organ, das anatomisch mit ihnen in Verbindung steht. Die Metastasen scheinen sich im Rahmen von speziellen Interaktionen zwischen den disseminierten Tumorzellen und lokalen positiven oder negativen Wachstumsfaktoren zu entwickeln, die die Proliferation supprimieren oder, mitunter erst nach langer Latenz, das Wachstum begünstigen können [RABES, PETERS, MUNK 1992].

1.2 METASTASEN EINES UNBEKANNTEN PRIMÄRTUMORS (CUP-SYNDROM) IM SCHRIFTTUM

Die starke Heterogenität dieser Patientengruppe bezüglich des klinischen Bildes und des histologischen Befundes erschwert die systematische Untersuchung dieses Problems ungemein, so dass der allgemeine Erkenntniszuwachs entsprechend langsam verlief. Hinzu kommt, dass die Diagnosestellung einer metastasierenden malignen Tumorerkrankung mit unbekanntem Primärtumor ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit überwiegend schlechter Prognose impliziert. Frühere Berichte über mögliche therapeutische Ansätze zeigten enttäuschende Ergebnisse mit einer niedrigen Rate von Respondern und ohne wesentlichen Einfluß auf eine mittlere Überlebensrate von 3-4 Monaten [WOODS et al. 1980].

In der Literatur hat es sehr verschiedene Ansätze gegeben, sich diesem komplexen Problem zu nähern. In einer 1977 veröffentlichten Arbeit von DIDOLKAR et al., die 254 Fälle mit CUP-Syndrom untersucht hatten, wobei in 30% der Fälle der Primärtumor autoptisch gesichert wurde, werden als häufigste Metastasenlokalisation Lunge, cervikale Lymphknoten, Knochen und Leber genannt. Am häufigsten befand sich der Primärtumor in der Lunge (40%), dem Pankreas (6,5%), dem Magen (6,5%), den Nieren (5,2%), den Ovarien (3,9%) und dem Kolon (3,9%). In den meisten Fällen handelte es sich um ein Adenokarzinom (41%).

Im gleichen Jahr erschien eine vergleichbare Studie von NYSTROM et al., die 264 Patienten mit CUP-Syndrom einschloß, wobei es sich histologisch um Adeno- oder undifferenzierte Karzinome handelte. Davon ließ sich in 107 Fällen der Primärtumor autoptisch sichern. Am häufigsten befand sich dieser im Pankreas (20%) und in der Lunge (18%). Die üblicherweise sehr häufig vorkommenden, die allgemeinen Krebsstatistiken anführenden Tumoren, wie das Mamma- oder Prostatakarzinom oder

die kolorektalen Karzinome spielten hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Ein weiteres überraschendes Ergebnis war, dass im Gegensatz zu den Befunden bei bekannten Primärtumoren beim CUP-Syndrom atypische Metastasierungsmuster zu beobachten waren. Obwohl üblicherweise 30-50% der Lungenkarzinome ins Skelett metastasieren, fanden sich Knochenmetastasen lediglich in 4% der CUP-Fälle mit letztlich nachgewiesenem Primärtumor in der Lunge. Dafür wiesen Patienten mit Pankreas- oder Lebertumoren eine ungewöhnlich hohe Inzidenz von Skelettmetastasen auf. Patienten mit Prostatakarzinom schließlich zeigten einen relativ geringen Anteil von Knochenmetastasen (25%) und einen hohen Anteil von Metastasen in der Lunge (75%) und der Leber (50%).

In einer retrospektiven Analyse über einen Zeitraum von 60 Jahren von ALTMAN und CADMAN (1985) wurden 1539 Patienten mit CUP-Syndrom erfaßt. Ihr Anteil an der Gesamtpatientenzahl mit maligner Grunderkrankung blieb über die Jahre relativ konstant bei 3%. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 5 Monaten. Während Patienten mit Plattenepithelkarzinommetastasen zum Teil gute Behandlungsergebnisse mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa einem Jahr zeigten, waren die Erfolgsaussichten einer Chemotherapie der am häufigsten vorkommenden Adenokarzinome (38%) enttäuschend. Der Anteil der Responder ging kaum über 20% hinaus. Im Vergleich zu den Nichtrespondern verlängerte sich dabei die mittlere Überlebenszeit nur um wenige Wochen.

Weniger umfangreiche Studien wurden vorgelegt von STEWART et al. (1979) mit 16 klassifizierten Primärtumoren, von JORDAN und SHILDT (1985) mit 18 Primärtumoren oder von HAMILTON et al. (1986) mit 38 Fällen von schließlich gesicherten Primärlokalisationen. Die geringen Fallzahlen werden plausibel, wenn man berücksichtigt, dass die Primärtumoren nur zu einem geringen Teil zu Lebzeiten der Patienten entdeckt werden. Selbst die Autopsie, die in einem Teil der Fälle durchgeführt werden kann, bringt häufig keine Klärung (in bis zu 27% der Fälle bei JORDAN und SHILDT).

LE CHEVALIER et al. berichteten 1988 über eine Autopsiestudie, die 302 Patienten mit CUP-Syndrom einschloß. Der Primärtumor konnte zu Lebzeiten in 27% der Fälle gesichert werden, autopsisch in 57% der Fälle. Meist handelte es sich um Pankreastumoren (26%) oder Lungentumoren (17%), gefolgt von Nieren- (5%) und kolorektalen Tumoren (4%).

Im Zusammenhang mit dem CUP-Syndrom lag der Gedanke nahe, dass man in Kenntnis der typischen Metastasierungsmuster von Tumoren in Abhängigkeit von der alters- und geschlechtsspezifischen Tumorinzidenz mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf den Sitz des Primärtumors schließen könnte. Mehrere Autoren haben zu diesem Thema Arbeiten publiziert. Als häufigste Erstlokalisation von Metastasen bei unbekanntem Primärtumor werden von Le Chevalier et al. (1988) vor allem Lymphknoten genannt, gefolgt von Lunge, Knochen, Gehirn, Haut und Leber. Aus der klinischen Erfahrung, die vom Metastasierungsverhalten bekannter Primärtumoren abgeleitet ist, sollte bei *Lungenmetastasen* besonders an Primärtumoren von Mamma, Niere, Hoden, Ovar und Schilddrüse gedacht werden. *Knochenmetastasen* sind typisch für das Prostatakarzinom, gefolgt von Primärtumoren der Mamma, der Niere, der Schilddrüse. Bei *Hirnmetastasen* steht bei der Frau die Mamma, beim Mann das Bronchialkarzinom im Vordergrund. Weiterhin können Melanome,

Nierenzellkarzinome, seltener Schilddrüsen- oder Hodentumoren verantwortlich sein. *Hautmetastasen* werden vor allem verursacht durch Mamma- und Lungentumoren, daneben von primären Hauttumoren. *Lebermetastasen* stammen meist aus Tumoren im Bereich des Pfortadereinstromgebietes, aber auch aus Mamma- und Lungentumoren [JUNGI und OSTERWALDER 1990].

BASSERMANN hat 1984 mit statistischen Mitteln versucht, auf den wahrscheinlichsten Primärtumor zu schließen, indem er von bestimmten haematogenen Organmetastasen ausging. Aus einer Obduktionsstatistik wurden Häufigkeit und Sequenz wichtiger hämatogener Metastasenlokalisationen (Lungen-, Leber-, Hirn- und Skelettmetastasen) für verschiedene Primärtumoren ermittelt. Mit den Daten der amtlichen Mortalitätsstatistik wurden dann alters- und geschlechtsabhängige Wahrscheinlichkeitsreihen für den Primärsitz von Tumoren bestimmt. Falls sich aus dem histologischen Tumortyp einer haematogenen Metastase keine ausreichenden Hinweise ergeben, sollten die genannten Wahrscheinlichkeitsreihen ergänzend zur Diskussion gestellt werden.

Allgemein wurde das *klinische* Herangehen an das Problem CUP-Syndrom sehr kontrovers diskutiert. Zum Teil wurde mit allen verfügbaren diagnostischen Möglichkeiten mehr oder weniger zielgerichtet nach dem Primärtumor gesucht. Viele lehnten jedoch eine ungezielte zeit- und kostenintensive Diagnostik mit subjektiv belastenden Untersuchungen ab, insbesondere wenn die Histologie für ein Adenokarzinom sprach, und beschränkten sich auf eine supportive Behandlung der Patienten [VON HEYDEN 1984].

Bei allen diagnostischen Bemühungen sollten zunächst die potentiell kurablen malignen Tumoren differenziert werden. Gute Heilungschancen bestehen für Lymphome, Keimzelltumoren und Trophoblasttumoren. Für die Lymphogranulomatose kommt auch in fortgeschrittenem Stadium eine kombinierte Radio-Chemotherapie oder eine alleinige Kombinationszytostase in Frage. Keimzelltumoren von Hoden und Ovar werden operativ, strahlen- und/oder chemotherapeutisch behandelt, maligne Trophoblasttumoren (invasive Mole und Chorionkarzinom) ebenfalls operativ und/oder chemotherapeutisch. Auch bei generalisierter Ausbreitung sind bei malignen Lymphomen und Keimzelltumoren noch gute therapeutische Erfolge zu erwarten [JASPERSEN 1992]. Palliative Behandlungserfolge durch Chemotherapie sind beim Mammakarzinom, beim Ovarialkarzinom oder beim kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu erwarten [SOUHAMI, TOBIAS 1995].

Unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors wurde der Effekt einer empirischen Chemotherapie beim CUP-Syndrom untersucht. In einer Übersichtsarbeit von SPORN und GREENBERG (1990) wurden die Ergebnisse einer systemischen Therapie beim CUP-Syndrom als überwiegend enttäuschend dargestellt, so dass in vielen Fällen eine symptomorientierte, palliative Behandlung im Vordergrund stehen muß. Allerdings haben sich für einige Krankheitsbilder trotz weiterhin unbekanntem Primärtumor spezielle Behandlungsstrategien durchgesetzt. Das betrifft:

1. *Plattenepithelkarzinommetastasen der zervikalen Lymphknoten.* Insbesondere wenn die Lymphknoten der oberen und mittleren Halsregion betroffen sind, muß der Primärtumor im Kopf-/Halsbereich angenommen werden. Auch wenn dieser letztlich nicht gefunden wird, hat sich eine Behandlung mit radikaler neck dissection oder eine Strahlentherapie oder eine Kombination von beiden Methoden bewährt. In der Literatur wurden 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 18% und 70% beschrieben [DE BRAUD et al. 1989].
2. Bei Frauen mit *axillären Lymphknotenmetastasen* ist ein Mammakarzinom sehr wahrscheinlich. Mitunter können sich Primärtumoren unter 2 cm Durchmesser der Diagnostik entziehen. Die Patientinnen sollten behandelt werden, als hätten sie ein occultes Mammakarzinom. Bei positivem Hormonrezeptorstatus kann eine zusätzliche Hormontherapie allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie effektiv sein. Die Prognose entspricht etwa der des Mammakarzinoms im Stadium II [HAINSWORTH, GRECO 1993].
3. Bei der *Peritonealkarzinose der Frau* ohne Primärtumor in den Ovarien bestehen ebenfalls relativ gute therapeutische Möglichkeiten. In den 80er Jahren konnten mit einer auf Cisplatin basierenden Chemotherapie bereits beachtliche Behandlungserfolge erzielt werden. Ähnlich wie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom wird oft zunächst eine chirurgische Tumormassenreduktion vorgenommen mit anschließender auf Cisplatin basierender Chemotherapie. Zum Teil konnten so über Jahre komplette Remissionen erreicht werden [STRNAD et al. 1989].
4. Schließlich gibt es in der Gruppe der *wenig differenzierten Karzinome bzw. Adenokarzinome* Patienten, die erfolgreich chemotherapeutisch behandelt werden können. Hierzu zählen zum einen jüngere Männer mit vorwiegendem metastatischem Befall des Mediastinums oder des Retroperitoneums mit zum Teil erhöhten Serumspiegeln für HCG und/oder AFP, die damit einen extragonadalen Keimzelltumor vermuten lassen. Auch neuroendokrine Tumoren, die sich immunhistologisch bzw. über den elektronenmikroskopischen Nachweis von neurosekretorischen Granula differenzieren lassen, können erfolgreich chemotherapiert werden [GRECO, HAINSWORTH 1993].

Unter Berücksichtigung der genannten klinisch-therapeutischen Aspekte haben GRECO und HAINSWORTH [1993] die folgende histologische Einteilung des CUP-Syndroms vorgenommen. Lichtmikroskopisch kann danach eine Differenzierung in vier Hauptgruppen erfolgen. Entsprechend dieser Einteilung ergeben sich auch wesentliche Unterschiede bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes, der therapeutischen Möglichkeiten und der Prognose.

1. Wenig differenziertes Neoplasma
Diese sehr weit gefaßte Bezeichnung bei einer Metastase unbekannten Ursprungs wird gewählt, wenn eine Einordnung in Kategorien wie Karzinom, Lymphom, Sarkom oder Melanom nicht gelingt. Das betrifft etwa 5% der Fälle. In dieser Gruppe findet sich ein relativ großer Anteil von Tumoren, die auf eine systemische zytostatische Therapie ansprechen, insbesondere aufgrund der Tatsache, dass sich in einigen Studien bei der weiterführenden Diagnostik in 35% bis 65% Lymphome nachweisen ließen, die entsprechend erfolgreich behandelt werden konnten [GATTER et al. 1985].
2. Gut bis mäßig differenziertes Adenokarzinom
Diese Diagnose wird am häufigsten gestellt und betrifft etwa 60% der Patienten mit unbekanntem Primärtumor. In den meisten Fällen werden Metastasen in der Leber, der Lunge und im Skelett gesehen. Im allgemeinen ist hier die Prognose schlecht mit einer mittleren Überlebensrate von wenigen Monaten. Auf eine Chemotherapie sprechen zwischen 7% und 39% der Patienten an. Komplette Remissionen sind sehr selten. Es gibt jedoch auch klinische Erscheinungsbilder innerhalb dieser Gruppe, für die sich spezielle Therapien als sinnvoll erwiesen haben. Hierzu gehören die bereits o.g. Peritonealkarzinose und die axillären Lymphknotenmetastasen der Frau.
3. Plattenepithelkarzinom
Zu dieser Gruppe zählen etwa 5% aller Patienten mit CUP-Syndrom. Am häufigsten findet man dabei einen Befall der cervikalen Lymphknoten von Patienten im mittleren bis höheren Lebensalter.
4. Wenig differenziertes Karzinom und wenig differenziertes Adenokarzinom
Die Patienten dieser Gruppe, die etwa einen Anteil von 30% ausmachen, unterscheiden sich deutlich von den vorgenannten. Oft sind Patienten im jüngeren Lebensalter mit einer kurzen Anamnese und einer raschen Verschlechterung des klinischen Zustandes betroffen. Metastasen treten vor allem im Mediastinum, Retroperitoneum und in peripheren Lymphknoten auf. Zahlreiche Patienten dieser Gruppe sprechen auf eine Chemotherapie an.

1.3 DIE BEDEUTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE FÜR DIE DIFFERENZIERUNG VON METASTASEN EINES UNBEKANNTEN PRIMÄRTUMORS

In den letzten 20 Jahren hat die Immunhistochemie in der Tumordiagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen. In den 80er Jahren spielte die Immunhistochemie bei einem vorliegenden CUP-Syndrom lediglich eine Rolle bei prinzipiellen Entscheidungen wie etwa zwischen Karzinom und Sarkom oder zwischen Adeno- oder Plattenepithelkarzinom. Abgesehen von Thyreoglobulin und der prostataspezifischen sauren Phosphatase war ein Rückschluß auf einen bestimmten Primärtumor nicht möglich [ALTMANNBERGER et al. 1984]. Diese Situation hat sich mit der Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper und unter Ausnutzung von verschiedenen Antikörper-Panelen deutlich verbessert, eine komplette Lösung des Problems ist jedoch noch nicht in Sichtweite.

Das Wesen der Immunhistochemie liegt in der In-situ-Identifikation von Zell- und Gewebsbestandteilen mit Antigencharakter durch Einsatz von Antigen-Antikörper-Reaktionen, die durch entsprechende Markierung von Antigen oder Antikörper mikroskopisch sichtbar gemacht werden [DENK 1986]. Im Wesentlichen handelt es sich um drei Gruppen von Zellmarkern, die mit Hilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden können:

- Intermediärfilamente,
- Oberflächenmarker und
- Intrazytoplasmatische Marker.

Als Elemente des Zytoskeletts kommen die Intermediärfilamente in den folgenden gewebsspezifischen Formen vor:

- | | |
|-----------------------------|---|
| - Epitheliale Zellsystem: | Zytokeratin |
| - Mesenchymales Zellsystem: | Vimentin |
| - Muskuläres Zellsystem: | Desmin |
| - Glia-Zellsystem: | gliafibrilläres saures Protein (= GFAP) |
| - Neuronales System: | Neurofilamente |

Die meisten Tumorzellen exprimieren diese Antigene entsprechend ihrem Ursprungsgewebe, so dass immunhistochemisch eine Zuordnung erfolgen kann [JASPERSEN 1992]. Dabei werden im direkten Verfahren primäre enzym- oder fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet oder im indirekten Verfahren markierte Anti-Antikörper. Die Antigen-Antikörperkomplexe werden dann mikroskopisch sichtbar, entweder lichtmikroskopisch über eine enzymatische Farbreaktion oder fluoreszenzmikroskopisch.

Weitere Tumor-Antigene können Enzyme sein (z.B. prostatic acid phosphatase (PAP), neuron-specific enolase (NSE)), normale Gewebskomponenten (z.B. Intermediärfilamente, common leucocyte antigen (CLA)), Hormone oder Hormonrezeptoren (z.B. Estrogenrezeptor), onkofetale Antigene (z.B. Alpha-Fetoprotein (AFP), carcinoembryonales Antigen (CEA)) und andere Substanzen (z.B. S-100 Protein).

Allerdings ist kaum ein Tumorzellmarker spezifisch und sensitiv genug, um für sich allein eine histologische Diagnose sichern zu können, wenn man einmal von den zuverlässigen Markern PAP und Thyreoglobulin absieht. Mit Hilfe von Tumormarkerkombinationen kann die Aussagefähigkeit deutlich erhöht werden. Auf diese Weise können eine Reihe von Tumoren ausgeschlossen werden oder Verdachtsdiagnosen gestellt werden [RUDDON, NORTON 1993]. So kann man mit Hilfe von Antikörpern gegen CLA und Zytokeratin eine Differenzierung zwischen Lymphom und Karzinom vornehmen (Karzinom: Zytokeratin-, epithelial membrane antigen (EMA)-positiv, CLA-negativ; Lymphom: CLA-positiv). Ebenso gibt es typische Muster für Sarkome, Melanome oder neuroendokrine Tumoren. Bei positiver PSA-Reaktion liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Prostata-Karzinom vor, bei Nachweis von Thyreoglobulin und Calcitonin sehr wahrscheinlich ein Schilddrüsenkarzinom. Bei der Interpretation muß allerdings berücksichtigt werden, dass kein Muster absolut spezifisch ist. Selbst die sehr aussagekräftigen Marker PSA und CLA können falsch positive oder falsch negative Ergebnisse bringen [GRECO, HAINSWORTH 1993].

In einer 1992 veröffentlichten Arbeit von KRÜGER et al. über die Bedeutung der Immunhistochemie in der Routinediagnostik von Metastasen unbekannter Primärtumoren wurden insgesamt 200 Metastasen von Tumoren klinisch-radiologisch zunächst nicht faßbaren Ursprungs immunhistochemisch aufgearbeitet. Die Identifikation des Ausgangstumors gelang über den Nachweis eines Leitmarkers (Prostata-, Schilddrüsenkarzinom, Lymphom oder Myosarkom) oder über bestimmte Markerprofile (kleinzelliges Bronchialkarzinom, Karzinoid, Melanom). Zum anderen konnte eine klinisch und morphologisch bestehende Verdachtsdiagnose mit immunhistochemischen Mitteln untermauert werden. In 76% der Fälle ließ sich der histologisch-immunhistochemisch angegebene Primärtumor schließlich sichern oder es bestand ein dringender klinischer Verdacht. Eine nahezu 100%ige Übereinstimmung wurde beim Prostata- und Schilddrüsenkarzinom, beim malignen Lymphom und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom erreicht. Beim malignen Melanom oder Karzinoid konnte dagegen eine immunhistochemische Diagnose nur zu einem geringen Prozentsatz gestellt werden. Die Differenzierung eines Plattenepithelkarzinoms ließ sich zwar immunhistochemisch erfassen, der Sitz des Primärtumors konnte allerdings nur unter Berücksichtigung der Metastasenlokalisation vermutet werden.

2 Aufgabenstellung

Die Diagnostik von Metastasen eines unbekannten Primärtumors (CUP-Syndrom) stellt im klinischen Alltag nach wie vor ein in vieler Hinsicht offenes Problem dar.

Histologisch handelt es sich am häufigsten um ein metastasierendes Adenokarzinom (in etwa 60% der Fälle). Die Immunhistochemie hat in den letzten Jahren entscheidend zur Differentialdiagnostik von Metastasen mit unbekanntem Primärtumor beigetragen. Nur für wenige Tumortypen existieren allerdings hochspezifische und zugleich hochsensitive Marker, wie beispielsweise das Thyreoglobulin für das Schilddrüsen- oder das PAP für das Prostatakarzinom, die eine relativ sichere Diagnose zulassen. In der Regel kommen Markerkombinationen zur Anwendung.

Aus der Vielzahl der verfügbaren Antikörper ergibt sich für den einzelnen Untersucher das Problem der mangelnden Überschaubarkeit von möglichen Markerkombinationen. Zum anderen ist die zunehmend breiter werdende Palette der angewendeten Antikörper ein nicht unerheblicher Kostenfaktor.

Die beiden zentralen Aufgaben der vorliegenden Arbeit sind:

1. Es soll ein statistisches Verfahren vorgeschlagen und untersucht werden, das es ermöglicht, auf der Grundlage von Tumormarkerspektren häufiger metastatischer Adenokarzinome
- die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Organlokalisierung eines klinisch-radiologisch nicht faßbaren metastasierenden Primärtumors anzugeben,
- innerhalb einer engen Auswahl von in Frage kommenden primären Adenokarzinomen zu differenzieren sowie
- die Validität der benutzten Tumormarker zu prüfen, um gegebenenfalls eine effektivere Markerauswahl treffen zu können.
2. Es soll geprüft werden, ob neben den immunhistochemischen Befunden auch allgemeine Patientendaten wie Alter, Geschlecht, Metastasenlokalisierung statistisch zu verwerten sind, um unter Berücksichtigung der typischen Metastasierungsmuster und der alters- und geschlechtsabhängigen Inzidenzen häufiger Adenokarzinome die Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Primärlokalisierung beim CUP-Syndrom zu erhöhen.

Damit soll für den Pathologen ein Hilfsmittel entstehen, das es ihm erlaubt, bei minimalem Zeitaufwand die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse überschaubarer und für die Differenzierung von Metastasen unbekannten Ursprungs besser nutzbar zu machen.

3 Material und Methoden

3.1 IMMUNHISTOCHEMIE

3.1.1 Histologisches Untersuchungsmaterial

Aus dem Routineuntersuchungsmaterial des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Charité der Jahre 1992-1998 gingen insgesamt 313 Paraffinblöcke von häufigen metastatischen nicht-muzinösen Adenokarzinomen in die vorliegende Arbeit ein. Die Primärtumoren waren bezüglich ihrer Lokalisation und der histologischen Klassifikation eindeutig bestimmt. Die Gruppe der untersuchten Präparate umfaßte die metastatischen Absiedlungen von 73 Mammakarzinomen, 37 Ovarialkarzinomen, 45 Lungenkarzinomen, 44 Nierenzellkarzinomen, 31 Pankreaskarzinomen, 42 Kolonkarzinomen, 41 Magenkarzinomen. Ganz überwiegend handelte es sich dabei um mäßig bis schlecht differenzierte Tumoren (166 G2-Tumoren, 143 G2-Tumoren) bis auf 4 gut differenzierte Tumoren. Die Geschlechtsverteilung war abgesehen von den häufig vertretenen Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane relativ ausgewogen für Kolon, Pankreas und Magen. Überwiegend männliche Patienten waren mit Nieren- und vor allem mit Lungenkarzinomen vertreten (Tab. 1). Die Patienten waren zwischen 26 und 95 Jahre alt. Ausgeschlossen wurden Tumoren, die mit immunhistochemischen Methoden im allgemeinen problemlos differenziert werden können, wie Prostata- oder Schilddrüsenkarzinome. Darüberhinaus beschränkten wir uns bei der Auswahl der Primärlokalisationen auf diejenigen, die am häufigsten als Tumoren unbekannten Ursprungs auftreten. So blieben beispielsweise Primärtumoren der Leber, Gallenwege oder Hoden- und Corpuskarzinome unberücksichtigt, die kaum im Rahmen eines CUP-Syndroms vorkommen. Feinnadel- bzw. sehr kleine Biopsien wurden ebenfalls nicht in die Untersuchung eingeschlossen.

Die Differenzierung von muzinösen und nicht-muzinösen Adenokarzinomen war vor allem deshalb notwendig, weil sich das immunhistochemische Verhalten von nicht-muzinösen und muzinösen (d.h. von serösen und endometrioiden) Ovarialkarzinomen grundsätzlich unterscheidet. Im vorliegenden Material durfte also keine prominente intrazytoplasmatische Schleimbildung in Form von Schleimvakuolen nachweisbar sein. Die Quantität der intraluminalen Schleimbildung (d.h. in größeren inter- oder intrazellulären Lumina) war dabei unerheblich. Darüberhinaus wurden auch alle Adenokarzinome ausgeschlossen mit einer interstitiellen Schleimablagerung von über 50% der gesamten Tumormasse.

Tab. 1: Untersuchte Fälle

Sitz des Primärtumors	Anzahl	Differenzierungsgrad			Geschlecht	
		G1	G2	G3	weiblich	männlich
Mamma	73	1	37	33	73	
Ovar	37		13	24	37	
Lunge	45		18	27	11	34
Niere	44		34	10	13	31
Pankreas	31		21	9	18	13
Kolon	42		36	6	24	18
Magen	41		7	34	23	18
Gesamtzahl	313		170	143	199	114

3.1.2 Allgemeine methodische Aspekte

3.1.2.1 Vorbehandlungen

Es wurden ausschließlich Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Präparate verwendet. Obwohl für die Erhaltung der Gewebsstrukturen eine Fixierung erforderlich ist, kann sie selbst für die Maskierung von Gewebsantigenen verantwortlich sein und zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Das heißt, es kommt zu Brückenbildungen zwischen reaktiven Endgruppen desselben Proteins oder benachbarter Proteine und damit zur Maskierung von Epitopen, den Angriffspunkten der Antikörper. Das Ausmaß der Maskierung wird unter anderem beeinflusst von der Fixierdauer, der Temperatur, der Konzentration der Fixierlösung und dem Vorhandensein benachbarter Proteine. Für den Nachweis zahlreicher Antigene ist daher eine Vorbehandlung erforderlich. Mit Hilfe von enzymatischen oder nichtenzymatischen Demaskierungsverfahren kann erreicht werden, dass die spezifische Antigenmarkierung verstärkt und die unspezifische Hintergrundanfärbung vermindert wird. Zu den enzymatischen Verfahren zum Aufbrechen der störenden Proteinbrücken zählen proteolytische Enzyme wie Trypsin, Pronase, Ficin etc.. Als nicht-enzymatische oder physikochemische Verfahren kommen die Schnellkochtopfmethode oder die Mikrowellenbehandlung zur Anwendung. Die Art des angewendeten Demaskierungsverfahrens (enzymatisch oder nicht-enzymatisch) hängt zum Teil vom Antigen ab. Es gibt Antikörper, die mit einem bestimmten Antigen nur nach Vorbehandlung reagieren und ausschließlich nach einer Methode, unabhängig von der Antigendichte im Gewebe. Nach CATTORETTI et al. (1993) können drei verschiedene Gruppen von Antigenen unterschieden werden:

- Antigene, die die Fixierung und Einbettung unbeschadet überstehen und durch zusätzliche Behandlungen zerstört werden (z.B. CD5 oder endogene Enzyme),

- Antigene, die am Routinematerial demonstriert werden können nach Trypsin- oder Hitzevorbehandlung, wobei mitunter feinabgestimmte Bedingungen bezüglich Fixierzeit und -konzentration erforderlich sind (z.B. CD2) und
- Antigene, die erst nach stark denaturierender Vorbehandlung nachweisbar werden (z.B. Intermediärfilamente).

Im vorliegenden Datenmaterial sind sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Vorbehandlungen verwendet worden:

Tab. 2: Vorbehandlungen

Verwendete Tumormarker	Vorbehandlungen
GCDFP (gross cystic disease fluid protein)	Pronase
CEA (carcinoembryonic antigen)	Schnellkochtopf
CK 20 (Zytokeratin 20)	Pronase
CK 7 (Zytokeratin 7)	Pronase
ER (Estrogenrezeptor)	Schnellkochtopf
Vimentin	Schnellkochtopf
Surfactant A	Schnellkochtopf

3.1.2.2 Immunhistochemische Detektionsverfahren

Die ursprünglich angewendete direkte Methode basiert auf der direkten Reaktion eines enzym-markierten Primär-Antikörpers mit einem Gewebsantigen und wurde später von der weit sensitiveren indirekten Methode abgelöst. Dabei wird ein unkonjugierter Primär-Antikörper an das Gewebsantigen gebunden, der wiederum mit einem enzymmarkierten Sekundär-Antikörper reagiert. Im Anschluß erfolgt an dieser Stelle die Umwandlung eines Substrats in ein Chromogen, das lichtmikroskopisch sichtbar wird.

Die für das vorliegende Datenmaterial angewendete LSAB-Methode (Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode) beruht auf der starken Affinität des Streptavidins zum Vitamin Biotin. Streptavidin ist ein Glycoprotein, das aus dem Bacterium *Streptomyces avidinii* extrahiert wird. Es besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils über eine Biotin-Bindungsstelle verfügen. Nachdem die Bindung eines unkonjugierten Primär-Antikörpers an das Gewebsantigen erfolgt ist, wird eine Inkubation mit einem biotinylierten Sekundär-Antikörper vorgenommen. An diesen kann nun als 3. Schritt ein enzymmarkierter Streptavidinkomplex anbinden. Als Enzyme kommen Peroxidase oder die hier verwendete alkalische Phosphatase in Frage, die für die Farbreaktion bei der

Umwandlung eines Substrates verantwortlich sind. Die alkalische Phosphatase zeichnet sich im Vergleich zur Peroxidase durch eine höhere Sensitivität aufgrund einer höheren Substrat-Umsatzrate aus. Bei der Anwendung muß allerdings das Problem der möglichen endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität berücksichtigt werden, die zuvor blockiert werden kann.

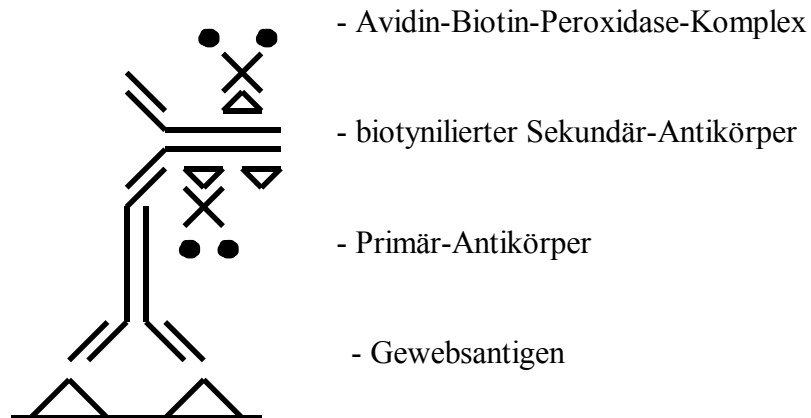


Abb. 1: LSAB- Methode (Abb. nach Boenisch, 1983)

3.1.3 Untersuchte Tumormarker

3.1.3.1 Intermediärfilamente

Als Bestandteil des Cytoskeletts kommen Intermediärfilamente in nahezu allen Zellen von Wirbeltieren vor. Ihre Bezeichnung leitet sich von der Tatsache ab, dass sie mit ihrer Größe zwischen 7 und 11 nm zwischen den Mikrofilamenten (6nm) und den Microtubuli (25nm) oder, wenn vorhanden, den Myosinfilamenten (15 nm) liegen [OSBORN et al., 1983].

Es lassen sich 5 verschiedene Klassen von Intermediärfilamenten unterscheiden, die für bestimmte Gewebe typisch sind:

1. Zytokeratine (epitheliale Zellen),
2. Vimentin (mesenchymale Zellen),
3. Desmin (Muskelzellen)
4. Neurofilament (Neurone)
5. Gliafilament (Gliazellen).

Da auch bei Malignomen entsprechend ihres Ursprungsgewebes Intermediärfilamente nachgewiesen werden können, besteht somit eine Möglichkeit zur Differenzierung. Allerdings können Tumorzellen auch gleichzeitig verschiedene Klassen von Intermediärfilamenten exprimieren.

In der Regel findet man bei epithelialen Tumoren nur Zytokeratine vor, die komplexer aufgebaut sind als die übrigen Intermediärfilamente. Man unterscheidet 2 Gruppen von sauer und basisch reagierenden Zytokeratinen. Die Epithelzellen exprimieren eine bestimmte Auswahl von Keratinen, und zwar immer paarweise eine saure und eine basische Untereinheit, spezifisch für einen epithelialen Phänotyp. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Komplexität eines Epithels und der Größe der Untereinheiten, die gebildet werden. Niedrigmolekulare Zytokeratine (40-54 kd) charakterisieren Zylinderepithel-typische, höhermolekulare (48-67 kd) dagegen Plattenepithel-typische Epithelien. Davon abgeleitete Neoplasmen verhalten sich meist entsprechend. Komplexe Epithelien wie im Respirationstrakt enthalten auch ein komplexes Muster von Zytokeratinen mit hohem und geringem Molekulargewicht. In den oberen Schichten von mehrschichtigen Plattenepithelien finden sich die Zytokeratine mit dem höchsten Molekulargewicht. In Abhängigkeit vom Profil der exprimierten Keratine besteht die Möglichkeit der weiteren Differenzierung epithelialer Tumoren, die auch bei wenig differenzierten Karzinomen oft erhalten bleibt. Die Expressionsmuster der Zytokeratine in normalen Epithelien, Tumoren und Zellkulturen sind von MOLL et al. (1982) katalogisiert worden.

In einigen bestimmten Tumorgruppen kommt bei der überwiegenden Zahl der Fälle eine Koexpression von Cytokeratin und Vimentin vor. Die fast regelmäßige Vimentinexpression bei solchen zytokeratin-positiven Tumoren könnte mit ihrer histogenetischen Nähe zum mesenchymalen Zellsystem zusammenhängen. Da dieses Phänomen nur bei einigen Tumortypen beobachtet wurde, kann es differentialdiagnostische Bedeutung erlangen [MOLL, 1986].

Im vorliegenden Datenmaterial sind die Zytokeratine CK 20, CK 7 sowie Vimentin verwendet worden, die im folgenden näher beschrieben werden.

CK 20 und CK

CK-20, ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 46 kd, kommt in einfachen Epithelien vor. Innerhalb der Gruppe der sauren Zytokeratine reagiert es am schwächsten sauer. CK-20 wird vor allem in den Epithelien des Darms, des Magens, im Urothel und in Merkel-Zellen vorgefunden. Es bildet eine Ausnahme in bezug auf die fehlende immunologische Kreuzreaktivität mit anderen sauer reagierenden oder Typ-I-Zytokeratinen. Auch monoklonale Antikörper gegen ein breites Spektrum von Zytokeratinen reagieren nicht mit CK-20. Daher wurde es möglich, verschiedene spezifische monoklonale Antikörper gegen dieses Protein zu entwickeln.

MOLL et al. haben 1992 in einer Studie gezeigt, dass CK-20 von einer klar definierten Anzahl von Primärtumoren und ihren Metastasen exprimiert wird. Die hohe Stabilität der Expression während der malignen Transformation läßt eine Nutzung als Malignitätsmarker nicht zu. Die Bedeutung liegt insbesondere in der Differenzierung von Metastasen mit unklarem Primärtumor. Ein positiver Nachweis von CK-20 innerhalb einer Adenokarzinommetastase läßt den Primärtumor im Kolon, Magen, biliären System oder Pankreas vermuten oder spricht für ein muzinöses Ovarialkarzinom. Gleichzeitig werden ein Adenokarzinom des Endometriums, der

Niere, der Schilddrüse, der Speicheldrüsen und ein nichtmucinöses Ovarialkarzinom ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Mamma- oder Lungenkarzinoms ist dann sehr gering. Andererseits ist bei CK-20-negativem Adenokarzinom der Ursprung von Magen, Gallengängen oder Pankreas weniger wahrscheinlich, ein primäres Kolonkarzinom sehr unwahrscheinlich.

Der Nachweis von CK 7 läßt ebenfalls eine Differenzierung verschiedener Typen von Adenokarzinomen zu. Charakteristisch ist beispielsweise die fehlende Expression bei kolorektalen- oder Leberzellkarzinomen. Nierenzellkarzinome, Prostatakarzinome und Karzinoide sind ebenfalls überwiegend CK7-negativ. Im Gegensatz dazu findet man ein positives Färbeergebnis normalerweise bei Adenokarzinomen der Lunge, des Pankreas, der Mamma, des weiblichen Genitaltrakts ebenso wie bei Urothelkarzinomen und Mesotheliomen [RAMAEKERS et al., 1990].

Vimentin

Vimentin ist ein singuläres Peptid mit einem Molekulargewicht von 57 kd. Es ist das wesentliche und gewöhnlich auch das einzige Intermediärfilament mesenchymaler Zellen, wie Fibroblasten, Endothelien, Makrophagen, und kommt auch in Melanocyten und Lymphocyten vor. Davon abgeleitet findet man Vimentin also in den meisten Sarkomen, Lymphomen und Melanomen vor.

Kennzeichnend ist die allgemein geringe Spezifität des Vimentins. Bei zahlreichen epithelialen Läsionen findet sich eine Co-Expression von Vimentin und Keratin (z.B. in Nierenzellkarzinomen, Schilddrüsen-, Endometrium-, Ovarial-, Lungen- oder Mammakarzinomen). Aus diesem Grund ist eine Anwendung monoklonaler Antikörper gegen Vimentin nur in Kombination mit anderen Markern sinnvoll [TRUE, 1990].

3.1.3.2 Weitere verwendete Tumormarker

CEA

CEA (carcinoembryonic antigen) ist das erste oncofetale Antigen, das 1965 von Gold und Freeman identifiziert und benannt wurde. Es handelt sich hierbei um ein vielfach glykosyliertes, hochmolekulares Glycoprotein. Es gewann seine größte Bedeutung in der klinischen Medizin als serologischer Indikator für das Wachstum des Kolonkarzinoms. Allerdings wurden später auch erhöhte CEA-Spiegel bei verschiedenen benignen entzündlichen Erkrankungen, bei Rauchern oder auch bei anderen Krebsleiden gefunden, so dass seine Rolle als Tumormarker im wesentlichen beschränkt bleibt auf die Verlaufskontrolle nach Tumorresektion, als möglicher Hinweis für ein Rezidiv bzw. metastatisches Wachstum [TRUE, 1990].

Das CEA verschiedener Karzinome erweist sich als heterogen bezüglich seiner physikochemischen und immunologischen Eigenschaften, so dass man nach Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern von einer CEA-Familie mit mindestens

22 verschiedenen Molekülvarianten sprechen muß. Hinzu kommen CEA-ähnliche Substanzen, die in verschiedenen anderen Geweben exprimiert werden und zu Kreuzreaktionen führen können. Der Nachweis mittels polyklonaler Antikörper zeichnete sich daher durch eine mangelnde Spezifität aus. Die Identifizierung der relativ gewebsspezifischen CEA-Subtypen mit monoklonalen Antikörpern gegen 5 bekannte Epitope läßt eine bessere Differenzierung zu.

CEA kommt in verschiedenen normalen Geweben wie Kolonschleimhaut, Milz, Knochenmark und Lunge sowie vor allem in schleimbildenden Adenokarzinomen vor, aber auch bei Plattenepithel- und kleinzelligen Lungenkarzinomen sowie C-Zellkarzinomen der Schilddrüse. Zu den nicht-neoplastischen gastrointestinalen Epithelien, die gelegentlich oder konstant CEA-positiv sind, gehören besonders Magenschleimhautmetaplasien. Ebenso können auch die Epithelien der Pankreas- und Gallengänge CEA exprimieren, insbesondere bei papillären Ganghyperplasien [KLÖPPEL, 1986].

In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen den Subtyp CEA-1 verwendet. Diese zeigten in einer vorangegangenen Studie die besseren Ergebnisse im Vergleich zu den gleichfalls verwendeten monoklonalen Antikörpern gegen die Epitope 2 und 3, insbesondere eine höhere Sensitivität bezüglich gastrointestinaler Tumoren [KAUFMANN et al, 1996].

GCDFP

Das GCDFP-Protein besteht aus verschiedenen Monomeren, die nach ihrem Molekulargewicht bezeichnet werden als GCDFP-15 (15 kd), GCDFP-24 (24 kd), GCDFP-44 und GCDFP-70 [HAAGENSEN et al., 1979]. Es wird exprimiert von Zellen mit apokrinen Eigenschaften wie z. B. von denen der Brustdrüse. Insbesondere monoklonale Antikörper gegen GCDFP-15 haben sich als hochspezifisch und sensitiv bei der Differenzierung von Mammakarzinomen und deren Metastasen erwiesen [WICK et al., 1989; MONTEAGUDO et al., 1990]. Auch bei wenig differenzierten Malignomen blieben die Markereigenschaften von GCDFP-15 weitgehend erhalten [MAZOUJIAN et al., 1983]. Nur in wenigen anderen Geweben konnte GCDFP bisher zum Teil auch nachgewiesen werden, in Speichel- und Tränendrüsen sowie in serösen Drüsen der Bronchialschleimhaut [MAZOUJIAN et al, 1983].

ER

Der Estrogenrezeptor (ER) gewinnt bei positivem Nachweis an malignen Tumoren besondere Bedeutung durch die mögliche Konsequenz einer Hormontherapie.

Bei dem Rezeptorprotein handelt es sich um ein Dimer bestehend aus zwei Untereinheiten mit jeweils 65 kd Molekulargewicht mit Lokalisation im Zellkern. Die darauf befindlichen Bindungsstellen für Estradiol und DNA sind ausreichend weit entfernt vom Epitop für den Antikörper, so dass die Antigenität nicht von der Bindung eines Liganden oder von Chromatin beeinflusst wird.

Estrogenrezeptoren werden in der Brustdrüse sowie im Bereich des weiblichen Genitaltraktes exprimiert. Sie steuern hier auch die Expression der Progesteronrezeptoren. Während die Rezeptoraktivität der Mamma unabhängig von Zyklus oder Menopause ist, bestehen im Endometrium bei überwiegender Progesteronrezeptoraktivität deutliche zyklusabhängige Schwankungen. Im Ovar gibt es normalerweise nur wenige Estrogenrezeptoren, dagegen findet man in malignen Ovarialtumoren oft eine stark erhöhte Rezeptoraktivität [TRUE, 1990].

Da der Progesteronrezeptor aufgrund seiner Estrogenabhängigkeit und der relativ inkonstanten Expression nur von untergeordneter Bedeutung bei der Differenzierung von metastasierenden Mamma- oder Ovarialkarzinomen ist, wurde hier auf dessen Nachweis verzichtet.

Surfactant A

Surfactant oder auch Antiatelektasefaktor wird ausschließlich in der Lunge von den kubischen Alveolarepithelzellen (Pneumocyten Typ II) produziert und dient hier zur Verminderung der Oberflächenspannung der Alveolen, um deren expiratorischen Kollaps zu verhindern. Es handelt sich um ein Stoffgemisch, das neben Lipiden und Kohlenhydraten auch eine Gruppe heterogener Proteine im Bereich von 5-70 kd beinhaltet. Gegen eine Reihe dieser Apoproteine wurden monoklonale Antikörper entwickelt zur Differenzierung primärer und sekundärer Lungentumoren bzw. zur Abgrenzung von pulmonalen gegenüber anderen Metastasen. Der relativ neue monoklonale Antikörper PE-10 gegen humane Surfactant-Apoproteine erwies sich als hochspezifisch bei der Differenzierung von primären Adenokarzinomen der Lunge. Plattenepithelkarzinome sind dagegen Surfactant-negativ [MIZUTANI et al., 1988; SHIMOSATO et al., 1992].

3.1.3.3 Begriffe: Markerkombination, Markerspektrum, Markerprofil

Der Begriff *Markerkombination* wird in der vorliegenden Arbeit im Sinne einer bewußten Auswahl von Tumormarkern zum Zwecke einer immunhistochemischen Untersuchung verwendet. Die Gesamtheit der Färbegergebnisse dieser Untersuchung ergibt das *Markerspektrum*. Unter *Markerprofil* wird hier das charakteristische Markerspektrum einer Tumorart verstanden.

3.1.4 Verwendete primäre Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3) sind alle verwendeten primären Antikörper mit Angabe der entsprechenden Klone, der Hersteller sowie der verwendeten Verdünnung zusammengefaßt.

Tab. 3: Überblick über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
CEA-1	II-7	DAKO, Hamburg	1:50
CK 7	OV-TL 12/30	DAKO	1:50
CK 20	Ks 20.8	DAKO	1:20
GCDFP-15	D6	Signet	1:40
Estrogenrezeptor	6F11	Novocastra, Newcastle u. Tyne	1:50
Surfactant A	PE10	DAKO, Japan	1:50
Vimentin	V 9	DAKO, Hamburg	1:50

3.1.5 Ablauf der immunhistochemischen Detektion

Die gründlich entparaffinierten und rehydrierten 3-5µm dicken Schnitte wurden entsprechend der zu untersuchenden Marker vorbehandelt (Schnellkochtopf, Pronase). Die Vorbehandlung mit Pronase erfolgte in Form von 0,1%iger Pronase E (Merck, Darmstadt) für 10 min (CK7) bzw. für 20min. (CK20) bei Raumtemperatur in PBS. Bei der Schnellkochtopf-Methode wurden die Schnitte in Citratpufferlösung bei einem pH-Wert von 6,0 über 5 min gekocht mit anschließender Kühlung im Wasserbad. Nach ausgiebiger Spülung mit TBS-Puffer wurden die Schnitte mit 10%igem normalem Ziegenserum blockiert und anschließend mit den primären Antikörpern (verdünnt in TBS mit 1%igem Bovinem Serumalbumin) in der feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Spülung mit TBS erfolgte die Inkubation mit den sekundären biotinylierten Antikörpern und anschließend mit dem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex.. Die Farbreaktion wurde erreicht durch die Immersion der Schnitte für 10 min in einer Lösung von Fast Red TR/Naphthol AS-MX Phosphat mit 0,15 mg/ml Levamisol aus gebrauchsfertigen Tabletten. Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer wurden die Schnitte mit Glycerolgelatine eingedeckt [KAUFMANN et al., 1996].

3.1.6 Interpretation der Gewebsreaktion

Bei der Auswertung der Färbeergebnisse (Leitz Labor Lux S-Mikroskop der Firma Leica) wurden zunächst die in der folgenden Tabelle dargestellten 4 Differenzierungsstufen festgelegt:

Tab. 4: Interpretation der Gewebsreaktion

Stufe	Anteil der angefärbten Tumorzellen	Ergebnis
0	keine Anfärbung	negativ
1	0-10%	schwach positiv
2	10-50%	positiv
3	>50%	stark positiv

Unterschieden wurde weiterhin zwischen diffuser und heterogener Anfärbung. Dokumentiert wurde dieser Befund in Form einer zweiten, zusätzlichen Ziffer, 1= heterogen und 2= diffus. Ein positiver Nachweis von Östrogenrezeptoren bezog sich dabei auf eine positive Kernreaktion.

Zur Vereinfachung des statistischen Verfahrens mußte diese Differenzierung weiterhin auf die Entscheidung „positiv“ oder „negativ“ ohne die zuvor genannten Abstufungen reduziert werden. Grundsätzlich wurde eine Anfärbung von mehr als 10% der Tumorzellen (Schätzwert) als sicher positives Ergebnis gewertet (Stufe 2 und 3 in Tab.4), unter 10% entsprechend als (eher) negatives Ergebnis (Stufe 0 und 1 in Tab.4).

3.2 VERFAHREN ZUR KLASSIFIKATION VON TUMORMARKERSPEKTREN

3.2.1 Einordnung des Klassifikationsverfahrens

Bei der statistischen Klassifikation geht es um Verfahren, die auf der Grundlage von Merkmalen Objekten Klassen zuordnen. Prinzipiell unterscheidet man zwischen

- überwachten und
- unüberwachten

Verfahren.

Bei den überwachten Verfahren liegt die Klassendefinition fest. Das bedeutet, dass man einerseits weiß, wieviele Klassen existieren und andererseits prinzipiell eine Möglichkeit hat, für ein Objekt zu entscheiden, welcher Klasse es zuzuordnen ist. Man hat die Möglichkeit, eine Lernstichprobe aufzunehmen, bei der für jedes Objekt die Ausprägung seiner Merkmale und die Klassenzugehörigkeit bekannt sind. Es gilt nun einen Klassifikationsalgorithmus (Klassifikator genannt) abzuleiten, der für weitere Objekte diese Zuordnung mit möglichst hoher Sicherheit vornimmt. Mit einer von der Lernstichprobe unabhängigen Teststichprobe kann dann die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit einer Zuordnung mit einem Klassifikator geschätzt werden. Diese Zuordnungswahrscheinlichkeit nennt man Klassifikationsgüte. Beispiele für die überwachte Klassifikation sind Schriftzeichenerkennung, Texturerkennung, Malignitätsgrading auf der Grundlage histologischer Merkmale.

Bei der unüberwachten Klassifikation weiß man vorher nicht, wieviele Klassen existieren und wodurch sie charakterisiert sind. Bei der unüberwachten numerischen Klassifikation (Merkmale liegen in Zahlenform vor) geht man von der Hypothese aus, dass Objekte *ein und derselben* Klasse im Merkmalsraum *enger* zusammen liegen (geringere euklidische Abstände voneinander haben) als Objekte unterschiedlicher Klassen. Deshalb sucht man nach Punktlustern im Merkmalsraum und versucht diesen eine Bedeutung zuzuordnen. Beispiele dafür sind die Zuordnung von Texturen in Satellitenbildern zu Feldern und deren Reifegrad oder die Bestimmung des Motilitätsgrades von Zellen auf der Grundlage von morphometrischer Bewegungsanalyse.

Bei der Klassifikation von Markerspektren handelt es sich um eine überwachte Klassifikation. Als Besonderheit ist festzuhalten, dass jedes Merkmal nur drei Ausprägungen haben kann (0 - negativ, 1- positiv, 2- unbekannt).

Damit ergibt sich bei einer endlichen Anzahl n von Merkmalen auch ein endliches Spektrum von möglichen Merkmalsausprägungen, nämlich 3^n . Die Probleme bei der

Zuordnung eines realen Falles anhand seines Markerspektrums bestehen insbesondere darin, dass

- ein identisches Markerspektrum in der Lernstichprobe nicht vorhanden sein muß und
- nicht alle Marker bestimmt sein müssen (2 - unbekannt).

Aufgrund dieser Randbedingungen wurde ein spezielles Klassifikationsprinzip entwickelt, das im folgenden Abschnitt vorgestellt wird.

3.2.2 Klassifikationsprinzip

3.2.2.1 Allgemeiner Ablauf der Klassifikation

Im n -dimensionalen Merkmalsraum gibt es exakt 3^n mögliche Merkmalsausprägungen, im folgenden Knoten genannt. Bei zwei Merkmalen sind dies die Kombinationen: 0-0, 0-1, 0-2, 1-0, 1-1, 1-2, 2-0, 2-1 und 2-2. Aufgrund der Lernstichprobe kennen wir in jedem Knoten j ($0 \leq j \leq 3^n - 1$) die genaue Anzahl c_{jk} der Fälle einer Klasse k . Wenn nun ein unbekannter Fall x klassifiziert werden soll, so sehen wir uns den Knoten an, der seiner Merkmalsausprägung entspricht. Anhand der Klassenverteilung in diesem Knoten wird eine Zuordnungsentscheidung getroffen. Eine Zuordnungsentscheidung wird nur dann getroffen, wenn die Zuordnungswahrscheinlichkeit in diesem Knoten über 50% liegt. Ist dies nicht der Fall oder sind für den betrachteten Knoten gar keine Fälle in der Lernstichprobe enthalten, so wird das Merkmal mit der geringsten Diskriminationsfähigkeit ermittelt, weggelassen und die Zuordnung erneut versucht. Als Merkmal mit der geringsten Diskriminationsfähigkeit wird dasjenige bestimmt, bei dessen Weglassen sich die Gesamtgüte des Klassifikators auf Basis der Lernstichprobe am wenigsten verringert.

Praktisch führt das Weglassen eines Merkmals zu einer Abbildung der Knoten eines m -dimensionalen Merkmalsraumes auf die eines $m-1$ -dimensionalen Merkmalsraumes. Im oben angegebenen Beispiel führt etwa das Weglassen des zweiten Merkmals zu folgender Addition der Werte (Fallanzahlen) in den Knoten: $0-0 + 0-1 + 0-2 = 0$, $1-0 + 1-1 + 1-2 = 1$, $2-0 + 2-1 + 2-2 = 2$. Damit werden die ursprünglich 9 Knoten auf 3 abgebildet. In den verbleibenden 3 Knoten ist dann die Gesamtzahl der Objekte der Lernstichprobe enthalten. Durch die Verdichtung kann die Wahrscheinlichkeit, eine Zuordnung treffen zu können, ansteigen.

Das Verfahren des Weglassens wird so lange sukzessiv angewendet, bis eine Zuordnungsentscheidung getroffen werden kann, bzw. kein Merkmal mehr weggelassen werden kann. Die Zuordnungswahrscheinlichkeit ergibt sich dann aus dem Verhältnis der Objekte der betrachteten Klassen im Knoten. Die Zuordnungswahrscheinlichkeit ist jedoch nicht der numerische Anteilswert der Klasse, sondern der Erwartungswert der a-posteriori-Verteilung, die unter Annahme der Gleichwahrscheinlichkeit als a-priori-

Verteilung bestimmt wurde [Formel (2), siehe HUFNAGL, VOSS 1985]. Durch diese direkte Güteschätzung entfällt die Unterteilung in Lernstichprobe und Teststichprobe.

3.2.2.2 Bezeichnungen

n	Anzahl der Merkmale.
$N_n = \{0, 1, 2, 3, \dots, 3^n - 1\}$	Menge der möglichen Merkmalskombinationen, Knoten genannt
m	Anzahl der Klassen
$M = \{0, 1, 2, \dots, m-1\}$	Menge der möglichen Klassen
$C = (c_{jk})$ mit $j = \{0, 1, \dots, 3^{n-1}\}$ und $k = \{0, 1, \dots, m-1\}$	Zuordnungsmatrix, Repräsentation der Lernstichprobe mit
c_{jk}	Anzahl der Fälle der Klasse k ($0 \leq k \leq m-1$), die die Merkmalskombinationen „ j “ besitzen
$\underline{x} = \begin{pmatrix} x_0 \\ \vdots \\ x_{n-1} \end{pmatrix}$	Merkmalskombination des Falls x , wobei $\forall x_i : 0 \leq x_i \leq 2$.

Hierbei bedeutet $x_i = 0$ dass der Marker negativ ist, $x_i = 1$ dass der Marker positiv ist und $x_i = 2$ dass der Marker nicht bestimmt worden oder das Ergebnis nicht eindeutig ist

Jeder Merkmalsausprägung (Markerspektrum) \underline{x} entspricht ein Knoten j aus dem Merkmalsraum N_n aller Knoten, der sich nach der folgenden Formel (1) bestimmen

läßt:

$$j(\underline{x}) = \underline{b}^T \underline{x} \quad \text{mit} \quad \underline{b}^T = (3^0, 3^1, \dots, 3^{n-1}) \quad (1)$$

Ist ein neuer Fall mit der Merkmalsausprägung \underline{x}_1 zu klassifizieren, so wird der dem Markerspektrum des Falles entsprechende Knoten $j(\underline{x}_1) = \underline{b}^T \underline{x}_1$ betrachtet. Die Zuordnungswahrscheinlichkeit p_{kj} des Knotens j zu einer Klasse k lässt sich mit der folgenden Formel bestimmen:

$$p_{kj} = \frac{c_{kj} + 1}{\sum_{i=1}^n c_{ij} + 2} \quad (2)$$

Dies ist der Erwartungswert der a-posteriori-Verteilung für die Klasse k unter der Voraussetzung, dass als a-priori-Verteilung die Gleichverteilung aller Klassen angenommen wird [HUFNAGL, VOSS 1985]. Ein Fall wird genau der Klasse k zugeordnet, für die dieser Erwartungswert maximal wird:

$$p_{k_{\max}j} = \max(k \in M) p_{kj} \quad (3)$$

Eine Klassifikationsentscheidung wird jedoch nur dann getroffen, wenn dieser Erwartungswert

$$p_{k_{\max}j} > 0,5$$

ist. Diese Wahrscheinlichkeiten können direkt aus der Zuordnungstabelle der Lernstichprobe bestimmt werden. Im Verlauf des Klassifikationsprozesses wird versucht, diese Zuordnungswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Das hier verwendete Verfahren nutzt dazu die Merkmalsselektion im Kontext der in Frage kommenden Klassen. Aus medizinischen Gründen kommt oft nur eine Teilmenge M_s aller Primärtumoren M in Frage:

$$M_s = \{k_1, k_2, \dots, k_s\} \subseteq M \quad (4)$$

Um den Klassifikator schrittweise zu verbessern wird jeweils das schlechteste Merkmal weggelassen. Als schlechtestes Merkmal bezeichnen wir das Merkmal, welches bei Wegfall zum geringsten Gesamtgüteverlust des Klassifikators bezüglich der relevanten Klassen M_s führt. Wir müssen deshalb die Formeln (2) und (3) auf M_s einschränken:

$$p_{kj}^{M_s} = \frac{c_{kj} + 1}{\sum_{k_i \in M_s} c_{k_i j} + 2} \quad \text{mit } k \in M_s \quad (5)$$

$$p_{k_{\max}j}^{M_s} = \max(k \in M_s) p_{kj}^{M_s} \quad (6)$$

Die Gesamtgüte G berechnet sich dann wie folgt

$$G = \sum_{j \in N_n \wedge p_{k_{\max}j}^{M_s} > 0,5} p_{k_{\max}j}^{M_s} * c_{k_{\max}j} \quad (7)$$

Läßt man nun ein Merkmal l der n Merkmale weg, so reduziert sich die Anzahl der Knoten auf $1/3$ und die Güteberechnung erfolgt nur noch über diese Knoten. Wir nennen diese Güte G_l^1 . Die „1“ steht dabei für das Weglassen des ersten Merkmals. Das für die Auftrennung der Klassen am wenigsten beitragende Merkmal l_{\min} ergibt sich als

$$G_{l_{\min}}^1 - G \geq G_l^1 - G \quad \forall l \quad (8)$$

Mit dieser Art der Merkmalsselektion wird solange fortgefahren, bis nur noch ein Merkmal vorhanden ist. Unter den so gewonnenen Entscheidungen wird die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ausgewählt.

Für diesen Erwartungswert läßt sich auch ein Konfidenzintervall angeben. Es wird dadurch berechnet, dass man die a-posteriori-Verteilung über die Zuordnungswahrscheinlichkeit

$$\frac{(S+1)!}{(S-T)!T!} p^T (1-p)^{S-T} \quad (9)$$

über die Intervalle $[0, t_1]$ und $[t_2, 1]$ so integriert, dass sich jeweils $\alpha/2$ ergibt. Das Intervall $[t_1, t_2]$ ist dann das Konfidenzintervall zur Irrtumswahrscheinlichkeit α .

Programm zur Klassifikation von Tumormarkerspektren
Das Programm TMB (Tumor Marker Berater) dient der systematischen Analyse von Tumormarkerkombinationen und besteht in der vorliegenden Form aus zwei Teilen. Im ersten Teil werden die vorhandenen Färbeergebnisse als Lernstichprobe eingelesen. Im zweiten Teil wird für ein konkretes Tumormarkerspektrum eine Zuordnungsentscheidung für das jeweilige Primärorgan getroffen. Die hier verwendete Lernstichprobe ist aufgrund laborspezifischer Besonderheiten nur bedingt übertragbar. Entsprechend der Zielsetzung und der bereits vorhandenen immunhistologischen Untersuchungsergebnisse können jedoch laboreigene Lernstichproben eingelesen werden, die dann die Grundlage für die zu ermittelnden Zuordnungswahrscheinlichkeiten bilden.

3.2.2.3 Einlesen der Daten

Die gesamten zu verwendenden Ergebnisse eines Labors sollen in Form einer Datei vorliegen. Das Programm TMB kann die Daten in Tabellenform importieren. Es werden die Formate von DBase und MS-Excel unterstützt. Die Tumormarkerbezeichnungen werden aus dem Tabellenkopf entnommen. Per Dialog können unerwünschte Spalten ausgeblendet werden. Über einen weiteren Dialog wird die Primärorgan-Spalte ausgewählt. Die gewählten Spalten werden nun eingelesen. Jede in diesen Spalten enthaltene Merkmalsausprägung wird in die Liste der möglichen Tumormarker-Werte aufgenommen.

Die eingelesenen Bezeichnungen sowohl für die Tumormarker selbst (Tabellenkopf), als auch für die Marker-Zustände können noch bearbeitet werden. Möglich ist sowohl ein einfaches Umbenennen einzelner Spalten/Zustände als auch das Zusammenlegen mehrerer Spalten/Zustände. So kann etwa "Spalte1: 00" umbenannt werden in "Marker X" und die Zustände "00", "10" und "11" können dem Zustand "negativ" zugeordnet werden. Dies ist z.B. notwendig, wenn für die Marker nicht nur die Färbeergebnisse positiv, negativ und unbestimmt registriert wurden, sondern ein Score bestimmt wurde, der jetzt mit bestimmten Schwellen zugeordnet werden muß. Durch dieses spezifische Einlesen der Daten entsteht eine konkrete Lernstichprobe. (Diese weicht in der Regel von der Primärdatei ab und kann in eine Datei geschrieben und von dort auch wieder eingelesen werden. So kann man unterschiedliche Interpretationen der Tumormarkerkombinationen und Scores gegeneinander testen.)

3.2.2.4 Berechnung der Zuordnungswahrscheinlichkeiten für eine vorgegebene Tumormarkerkombination

Nach dem Einlesen der Daten sind im linken Teil des Programmfensters die bekannten Tumormarker mit ihren möglichen Zuständen tabellarisch aufgelistet. Pro Marker kann der jeweilige Zustand ausgewählt werden, die Voreinstellung ist "Marker undefiniert" für alle Marker.

Liegt weiteres Vorwissen zum untersuchten Fall vor, so kann über den Organauswahl-Dialog die Menge der in Frage kommenden Organe (Klassen) eingeschränkt werden.

Als weitere Option ist in der Menüleiste die Berechnung von Vertrauensintervallen vorgesehen. Standardmäßig berechnet das Programm die sogenannte Punktschätzung (Erwartungswert der a-posteriori-Verteilung) für die Klassenzugehörigkeiten (Primärorgan-Zuordnungswahrscheinlichkeit). Die a-posteriori-Verteilung ist eine Binomialverteilung. Neben der Punktschätzung, die den wahrscheinlichsten Wert liefert, ist es sinnvoll durch ein Konfidenzintervall die Zuverlässigkeit der Schätzung zu bestimmen. Das Konfidenzintervall (Vertrauensintervall $[t_1, t_2]$) kann zu einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit p berechnet werden. Wenn etwa $p=0.05$ angenommen wird, so liegt der wahre Wert mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit innerhalb

des Vertrauensintervalls. Das Vertrauensintervall wird um so schmaler, je mehr Fälle für die Berechnung zur Verfügung stehen. Anhand der Vertrauensintervalle kann die Sicherheit der statistischen Aussage abgeschätzt werden.

3.2.2.5 Einbeziehung von a-priori-Wahrscheinlichkeiten

Aus verschiedenen Gründen können die jeweiligen Anteile der verschiedenen Tumoren in der Stichprobe stark variieren. Allein aus dieser Häufigkeit heraus könnten dann Zuordnungen getroffen werden. Sind etwa 95% aller Fälle einer Tumorart zuzuordnen, so wird diese Tumorart mit 95% Wahrscheinlichkeit völlig unabhängig vom Marker-Spektrum ausgewählt. Um die Lernstichprobe bezüglich der Häufigkeit der Tumorarten annähernd homogen zu gestalten, besteht die Möglichkeit ausgleichende Gewichte einzuführen. Die in dieser Arbeit verwendete Stichprobe enthält beispielsweise überdurchschnittlich viele Fälle von Mammakarzinommetastasen (ca 43%), während z.B. die Primärlokalisation im Pankreas eher selten ist (ca 6%). Das führt zu der statistischen Aussage, dass bei einem vorliegenden unbekannten Fall bereits ohne Berücksichtigung der Färbeergebnisse ein primäres Mammakarzinom siebenmal wahrscheinlicher als ein Pankreaskarzinom ist. Diese Aussage wäre durchaus sinnvoll, wenn die Stichprobe der tatsächlichen Inzidenz der Tumoren entsprechen würde, nicht jedoch, wenn die Häufigkeit aus einer bestimmten Spezialisierung des Untersuchers resultiert. Für diesen Fall ist es angemessener von gleichverteilten a-priori-Wahrscheinlichkeiten auszugehen, indem hier Pankreaskarzinom-Fälle höher gewichtet werden als Mammakarzinom-Fälle, so dass a priori alle Primärorgane annähernd gleich wahrscheinlich vorkämen. Wegen der zu Grunde gelegten Binomialverteilung sind nur ganzzahlige Gewichte sinnvoll, die vom Programm automatisch berechnet werden. Sie sind aktiv, wenn in der Menüleiste die Option "Gewichte" aktiviert ist. Per Dialog können die vom Programm berechneten Gewichte manuell korrigiert werden, so dass sie bei Vorliegen bekannter a-priori-Wahrscheinlichkeiten für die jeweiligen Primärorgane angepaßt werden können.

3.2.2.6 Ergebnisausgabe und Interpretation

Nach Eingabe der bekannten Markerzustände (positiv, negativ oder nicht definiert), wobei die Betrachtung des Färbeergebnisses eines einzelnen Tumormarkers als auch der kompletten Kombination möglich ist, und nach Aktivierung des Feldes Berechnen! erscheinen im Ergebnisfeld die ermittelten Wahrscheinlichkeitsreihen. Dabei wird die höchstmögliche Wahrscheinlichkeit in der ersten Reihe angezeigt unter Angabe des Primärorgans und der hierfür entscheidenden Tumormarkerzustände. Daneben kann nach entsprechender Aufforderung das oben beschriebene Konfidenzintervall berechnet werden. Von einer ausreichend hohen Zuordnungswahrscheinlichkeit wird bei erreichten Werten über 90% ausgegangen.

In der folgenden Abbildung 2 wird beispielhaft die Zuordnungswahrscheinlichkeit für den hochspezifischen Marker GCDFP-15 berechnet.

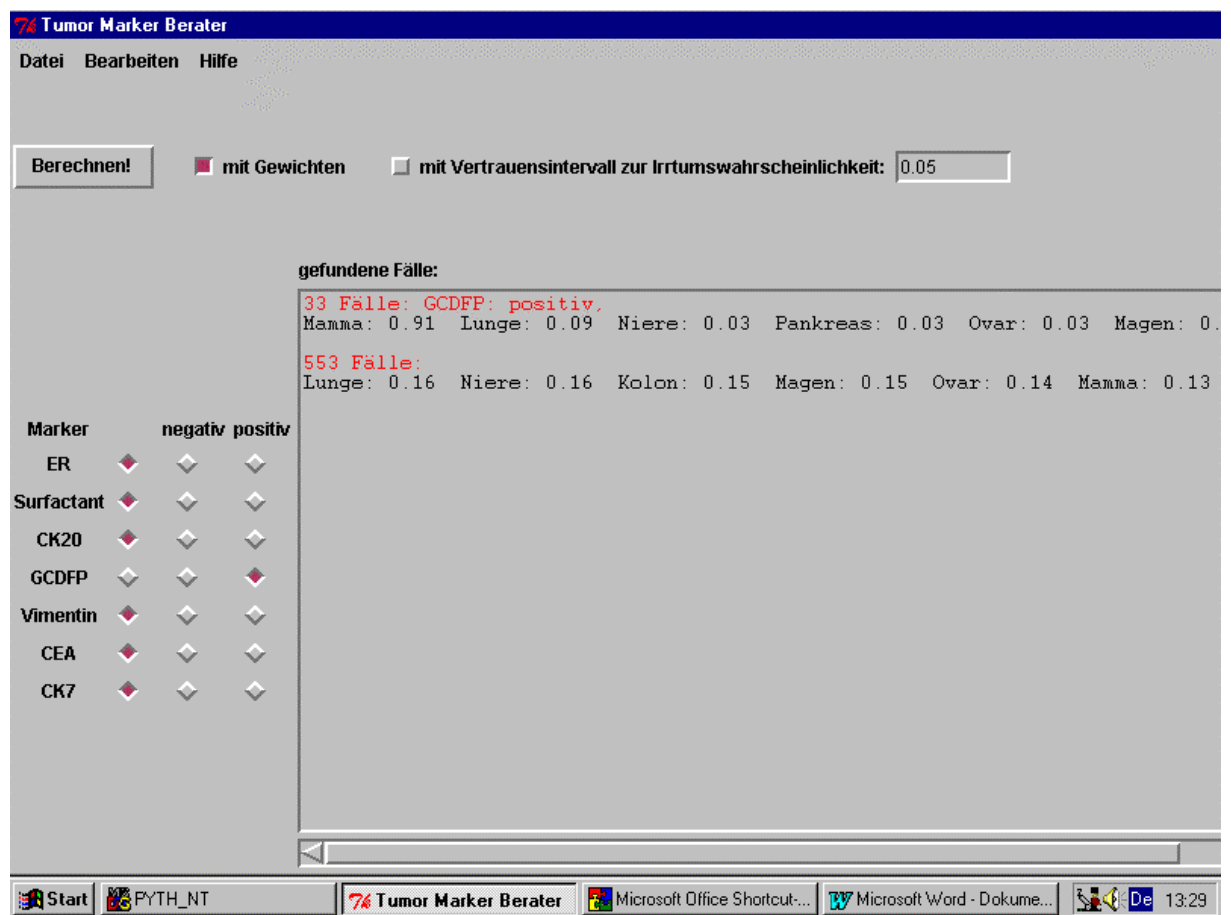


Abb. 2: Tumormarkerberater , GCDFP positiv

Im nächsten Beispiel wird ein komplexes Tumormarkerspektrum gezeigt, dass spezifisch ist für ein primäres Kolonkarzinom mit einer Zuordnungswahrscheinlichkeit von 96%.

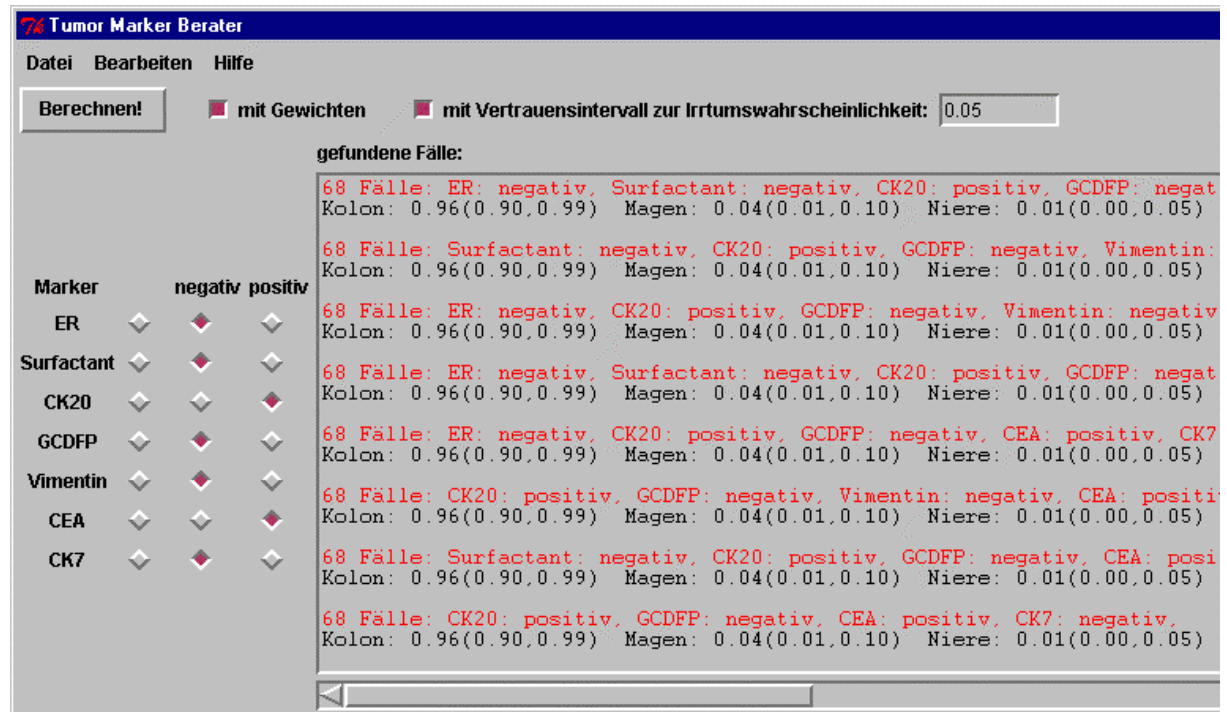


Abb. 3: Tumormarkerberater, typisches Kolonkarzinommuster

3.3 ERFASSUNG KLINISCH-EPIDEMIOLOGISCHER DATEN ZUR VORHERSAGEWAHRSCHEINLICHKEIT DES PRIMÄRTUMORS BEIM CUP-SYNDROM

Es wurden aus Autopsiestudien der letzten 25 Jahre, die sich mit dem CUP-Syndrom befaßt haben, Daten über die Häufigkeit der letztlich im weiteren klinischen Verlauf oder autopsisch gesicherten Primärtumoren [NYSTROM et al. 1977; STEWART et al. 1979; DIDOLKAR et al. 1977; OSTEN et al. 1977; JORDAN, SHILDT 1985; HAMILTON et al. 1986] sowie über die Häufigkeit der metastatischen Erstmanifestationen erfaßt und gegenübergestellt [LE CHEVALIER et al, 1988; HOLMES, FOUTS 1970; SNEE, VYRAMUTHU 1985, NYSTROM et al. 1977].

Zum Vergleich wurden die Angaben zum Inzidenzmuster der häufigsten Tumoren dem regionalen Krebsregister entnommen. Zusätzlich fanden Daten zum haematogenen Metastasierungsverhalten von Tumoren aus großen Autopsiestudien Verwendung [NOLTENIUS 1987; WILLIS 1973].

4 Ergebnisse

4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEERGEBNISSE

In der folgenden Tabelle wird ein Überblick über sämtliche Färbeergebnisse für die untersuchten Metastasen gegeben.

Tab. 5: Zusammenfassung der Färbeergebnisse für die untersuchten Tumormarker, p=positiv, n=negativ,

Primär-tumor	N	CEA		CK7		CK20		ER		GCDFP-15		Surfactant A		Vimentin	
		p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n
Mamma	73	21 29%	52 71%	68 93%	5 7%	0 100%	73	27 37%	46 63%	31 42%	42 58%	0 100%	73	14 19%	59 81%
Ovar	37	3 8%	34 92%	36 97%	1 3%	4 11%	33 89%	20 54%	17 46%	0 100%	37	0 100%	73	22 59%	15 41%
Lunge	45	36 80%	9 20%	40 89%	5 11%	6 13%	39 87%	1 2%	44 98%	1 2%	44 98%	18 40%	27 60%	12 27%	33 73%
Niere	44	0 100%	44 100%	3 7%	41 93%	2 4%	42 96%	0 100%	44 100%	0 100%	44 100%	0 100%	44 100%	44 100%	0
Kolon	42	42 100%	0	5 12%	37 88%	37 88%	5 12%	0 100%	42 100%	0 100%	42 100%	0 100%	42 100%	0	42 100%
Magen	41	36 88%	5 12%	36 88%	5 12%	22 54%	19 46%	0 100%	41 100%	0 100%	41 100%	0 100%	41 100%	0	41 100%
Pankreas	31	29 94%	2 6%	31 100%	0	18 58%	13 42%	0 100%	31 100%	0 100%	31 100%	0 100%	31 100%	1 3%	30 97%

4.2 DIFFERENZIERUNG VON PRIMÄRTUMOREN AUF DER GRUNDLAGE VON TUMORMARKERSPEKTREN

In den folgenden Abschnitten werden die Markerspektren der einzelnen Primärtumoren und die daraus resultierenden Differenzierungsmöglichkeiten dargestellt. Der errechneten Zuordnungswahrscheinlichkeit folgt jeweils in Klammern die Angabe des Vertrauensintervalls bei einer postulierten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ (z.B. für GCDFP positiv: Zuordnungswahrscheinlichkeit zum Primärorgan Mamma 91% (80-98%)).

4.2.1 Differenzierung von Mammakarzinommetastasen

Die Gruppe der Mammakarzinommetastasen stellt mit 73 Fällen die mit Abstand größte dar. Davon konnte in 34 Fällen (46%) aufgrund des Tumormarkerspektrums mit hoher Wahrscheinlichkeit ($\geq 90\%$) eine richtige Zuordnung zum entsprechenden Primärtumor erfolgen. Die relativ hohe Diagnosesicherheit beruht vor allem auf der Anwendung eines hochspezifischen Markers für das Mammakarzinom, des GCDFP-15. Bei einem positiven Färbeergebnis wurde unabhängig vom übrigen Spektrum bereits eine Wahrscheinlichkeit von 91% für das Mammakarzinom angegeben. Bei einem positiven Estrogenrezeptor(ER)-Nachweis ist die Wahrscheinlichkeit für ein primäres Ovarialkarzinom dagegen vergleichbar mit derjenigen für ein Mammakarzinom. Die höchste Diagnosesicherheit wurde mit 97% für die Kombination GCDFP-15 „positiv“ und CK7 „positiv“ erreicht. Letzteres war bei Mammakarzinommetastasen fast immer in Kombination mit GCDFP-15 „positiv“ nachweisbar, im Gegensatz zu dem einzigen GCDFP-15-positiven Fall außerhalb eines Mammakarzinoms, der eine Lungenkarzinommetastase betraf. Eine hohe Zuordnungswahrscheinlichkeit zum Mammakarzinom wurde auch von der Kombination GCDFP-15 „positiv“ mit ER „positiv“ (95%) erreicht.

War GCDFP-15 negativ, wie in 42 Fällen, so waren davon nur noch 3 Fälle mit hoher Wahrscheinlichkeit richtig zuzuordnen. Dafür war die Kombination eines positiven Estrogenrezeptors mit einem positiven CEA-Nachweis und negativen Färbeergebnissen für Surfactant und CK20 oder Vimentin verantwortlich. Nur in dieser Konstellation konnten die GCDFP-15-negativen Mammakarzinommetastasen von den Ovarialkarzinommetastasen, die hier die meisten differentialdiagnostischen Probleme bereiteten, ausreichend abgegrenzt werden.

In der folgenden Tabelle sind die Markerspektren aufgeführt, die eine mit hoher Wahrscheinlichkeit zutreffende Diagnose erlaubten.

Tab. 6: Typische Tumormarkerspektren bei Mammakarzinommetastasen (Angabe des Vertrauensintervalls bei Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$)

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	Zuordnungswahrscheinlichkeit für Mammakarzinom
positiv							91% (80-98%) [31 Fälle]
positiv					positiv		95% (82-100%) [18 Fälle]
positiv				positiv			97% (84-99%) [27 Fälle]
negativ	positiv	negativ	negativ		positiv	negativ	94% (81-100%) [3 Fälle]

In 19 Fällen war dagegen eine Entscheidung zwischen Ovar (54%) und Mamma (49%) als mögliches Primärorgan nicht zu treffen, und zwar dann, wenn bei negativen übrigen Ergebnissen lediglich CK7 nachgewiesen wurde. Eine zusätzliche Estrogenrezeptorpositivität ließ die Zuordnungswahrscheinlichkeit in Richtung Ovarialkarzinom anwachsen (85%). Daneben kamen als Fehlinterpretationen mit geringerer Zuordnungswahrscheinlichkeit vor allem die Niere bei positivem Vimentinnachweis (75%) und in einem Fall bei positivem CEA-Nachweis das Kolon (88%) als Primärsitz vor.

In einem Fall lag zwar aufgrund einer Kombination von GCDFP-15 „positiv“ mit CEA „negativ“ eine Zuordnungswahrscheinlichkeit von 94% für das Mammakarzinom vor, gleichzeitig wurde aber auch auf der Grundlage eines positiven Vimentinnachweises bei negativem CK7 mit 99% für ein Nierenkarzinom entschieden. Eine Entscheidung aufgrund der ermittelten Zuordnungswahrscheinlichkeiten konnte also nicht getroffen werden. Als Untersucher würde man jedoch in diesem Fall, der im übrigen eine der 5 CK7-negativen Mammakarzinommetastasen betraf, den positiven Nachweis des hochspezifischen GCDFP-15 höher bewerten als das Fehlen des weniger spezifischen CK7 und sich für ein primäres Mammakarzinom entscheiden.

Tab. 7: Atypische Tumormarkerspektren bei Mammakarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	54% Ovar(45-62%) 49% Mamma* [19 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	85% Niere (73-93%) 66% Mamma* [6 Fälle]
Negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	75% Niere (66-82%) 44% Mamma* [12 Fälle]
Positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	99%Niere (93-100%) 94%Mamma* (80-100%) [1Fall]
Negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	88% Kolon (81-94%) 26% Mamma* [1 Fall]

* innerhalb des angegebenen Markerspektrums maximale Zuordnungswahrscheinlichkeit für die zutreffende Primärlokalisation Mamma

Die Möglichkeit einer zutreffenden Diagnose verringerte sich mit zunehmender Entdifferenzierung deutlich. Während bei insgesamt 40 G2- und G1-Tumoren in 25 Fällen (62%) mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% die Diagnose eines primären

Mammakarzinoms gestellt werden konnte, war dies bei insgesamt 33 G3- Tumoren nur in 9 Fällen (27%) möglich (Tab.8).

Tab. 8: Diagnosewahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

Differenzierungsgrad	Fallzahl	Fallzahl mit $\geq 90\%$ Zuordnungswahrscheinlichkeit für Mammakarzinom
G 1	3	3 (100%)
G 2	37	22 (59%)
G 3	33	9 (27%)

4.2.2 Differenzierung von Ovarialkarzinommetastasen

Für das Ovarialkarzinom fehlt ein organspezifischer Tumormarker im verwendeten Panel. Der Estrogenrezeptor kommt in ähnlicher Weise auch bei den Mammakarzinomen vor. Von den insgesamt 37 untersuchten Ovarialkarzinommetastasen wurde in 12 Fällen (32%) das primäre Ovarialkarzinom korrekt als wahrscheinlichster Ursprung berechnet. Die hohe Zuordnungswahrscheinlichkeit von 96% wurde erreicht bei der Kombination eines positiven Nachweises von Estrogenrezeptor, Vimentin und CK7. War Vimentin in dieser Konstellation nicht nachweisbar, so konnte bei negativem Ergebnis für GCDFP-15 die richtige Zuordnung lediglich mit einer 85%igen Wahrscheinlichkeit erfolgen, wie in weiteren 7 Fällen. Bei negativem Estrogenrezeptor gelang nur in einem Fall die korrekte Zuordnung mit einer Wahrscheinlichkeit von 88% bei der Kombination eines positiven Färbeergebnisses für Vimentin, CK7 und CK20 mit negativem für GCDFP-15 und CEA.

Tab. 9: Typische Markerspektren von Ovarialkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	96% Ovar (86-100%) [12 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	85% Ovar (73-93%) [7 Fälle]
Negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	88% Ovar (59-100%) [1 Fall]

Die wichtigsten Fehlinterpretationen betrafen mit 94% Zuordnungswahrscheinlichkeit in 2 Fällen die Lunge als Primärsitz und mit 92% einmalig die Niere. Letztere wurde in

7 weiteren Fällen mit 75% Zuordnungswahrscheinlichkeit genannt bei positivem Nachweis für Vimentin und CK7 und negativen übrigen Ergebnissen. Bei lediglich positivem CK7 und negativen übrigen Ergebnissen konnte in 7 Fällen keine Entscheidung getroffen werden; das Ovar als Primärsitz lag jedoch mit 54% an der Spitze der Wahrscheinlichkeitsreihe.

Tab. 10: Atypische Markerspektren bei Ovarialkarzinommetastasen

GCDFFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	94% Lunge (78-100%) [2 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	92% Niere (85-97%) 85% Ovar* [1 Fall]
Negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	75% Niere (66-82%) 65% Ovar* [7 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	54% Ovar (45-62%) [7 Fälle]

* maximal mögliche Zuordnungswahrscheinlichkeit für das primäre Ovarialkarzinom

Bei deutlich überwiegender Anzahl der schlechter differenzierten G3-Tumoren (24) gegenüber den besser differenzierten G2-Tumoren (13) konnte eine Beziehung der Abgrenzbarkeit von Ovarialkarzinommetastasen zum Differenzierungsgrad nicht festgestellt werden. Unter den Fällen die mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit richtig zugeordnet werden konnten, befanden sich 3 G2-Tumoren und 8 G3-Tumoren.

4.2.3 Differenzierung von Kolonkarzinommetastasen

Unter insgesamt 42 untersuchten Kolonkarzinommetastasen war eine richtige Zuordnung mit hoher Wahrscheinlichkeit, d.h. mit über 90%, in 33 Fällen (78%) möglich. Kein anderes Organ wurde mit dieser hohen Wahrscheinlichkeit als Primärsitz angegeben. Für die hohe Diagnosesicherheit von 96% war vor allem der positive Nachweis von CEA und CK 20 bei Abwesenheit von CK 7 verantwortlich. Die größte Bedeutung kommt hierbei den Markern CK7 (negativ) und CK20 (positiv) zu, die zusammen bereits eine Zuordnungswahrscheinlichkeit in Richtung Kolon von 86% ausmachen. Das CEA war in jedem getesteten Fall positiv und konnte zusätzlich zur eben genannten Kombination die Diagnosesicherheit nochmals erhöhen auf 93%. Ein positives Färbeergebnis für CEA bei sonst ausschließlich negativen Färbeergebnissen sprach in 4 Fällen mit 88%iger Wahrscheinlichkeit für ein primäres Kolonkarzinom. Eine Differenzierung von den übrigen gastrointestinalen Tumoren (ausgehend von

Magen und Pankreas) war immer dann nicht möglich, wenn der Nachweis für CK7 positiv ausfiel, wie in 5 weiteren Fällen.

Ein Einfluß des Differenzierungsgrades auf die spezifischen immunhistologischen Eigenschaften war nicht erkennbar. Allerdings waren in dieser Gruppe die wenig differenzierten Tumoren nur in geringer Zahl vertreten (6 G3-Tumoren versus 36 G2-Tumoren).

Tab. 11: Tumormarkerspektren bei Kolonkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK 20	CK 7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	96% Kolon (90-99%) [33 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	88% Kolon (81-94%) [4 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	54% Magen (44-59%) 52% Kolon 34% Pankreas [4 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	49% Pankreas (38-61%) 46% Magen 38% Kolon [1 Fall]

4.2.4 Differenzierung von Magenkarzinommetastasen

Es wurden insgesamt 41 Magenkarzinommetastasen immunhistochemisch untersucht. Auf der Grundlage der verwendeten Tumormarkerkombination war eine sichere Differenzierung nicht möglich. Insbesondere konnte eine Abgrenzung von dem sehr ähnlichen Markerspektrum der Pankreaskarzinommetastasen nicht gelingen. Diese Tatsache wird dadurch widerspiegelt, dass in 32 Fällen (78%) die angegebenen Zuordnungswahrscheinlichkeiten für beide Primärorgane etwa um 50% betragen. Ein typisches Markerprofil für Magenkarzinommetastasen ergab sich nicht. Für beide Primärorgane, Pankreas und Magen, war die Kombination eines positiven CEA- und CK7-Nachweises bei inkonstant positivem CK20 und negativen übrigen Ergebnissen sehr häufig. War CK7 negativ, wie in 5 Fällen, so fiel die Entscheidung bei positivem CEA für das Primärorgan Kolon, und zwar mit einer Wahrscheinlichkeit von 88% bei fehlendem CK20 und 96% bei nachgewiesenem CK20. Bei negativem Färbeergebnis für CEA genügte auch ein positiver Nachweis von CK20 bei sonst negativen Ergebnissen für eine hohe Zuordnungswahrscheinlichkeit (93%) zum Kolonkarzinom. In 2 Fällen kam es auf diese Weise in der Gruppe der Magenkarzinommetastasen zu einer klaren Fehlinterpretation. In 4 weiteren Fällen war lediglich CK7 nachgewiesen

worden bei negativen übrigen Ergebnissen, so dass keine Entscheidung getroffen werden konnte. (Tab.12)

Tab. 12: Markerspektren bei Magenkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK 20	CK 7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	54% Magen(43-65%) 52% Kolon 34% Pankreas [20 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	49% Pankreas (38-61%) 46% Magen* [12 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	96% Kolon (90-99%) [1 Fall]
Negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	93% Kolon (86-98%) [1 Fall]
Negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	88% Kolon (81-94%) 41% Magen* [3 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	54% Lunge (46-62%) 39% Magen* [4 Fälle]

*innerhalb des angegebenen Tumormarkerspektrums maximale Zuordnungswahrscheinlichkeit für das zutreffende Primärorgan Magen

4.2.5 Differenzierung von Pankreaskarzinommetastasen

Eine sichere Differenzierung der 31 Pankreaskarzinommetastasen war auf der Basis der vorliegenden Daten nicht möglich. Aufgrund der bereits erwähnten weitgehenden Übereinstimmung der Markerspektren mit denen der Magenkarzinommetastasen war keine Abgrenzung möglich. Allerdings kam es hier wegen der konstanten Expression von CK7 nicht zu Fehlinterpretationen des Kolonkarzinoms betreffend. In einem Fall wurde als wahrscheinlichster Primärtumor ein Lungenkarzinom genannt (85% Zuordnungswahrscheinlichkeit), in 2 Fällen war lediglich CK7 nachweisbar bei negativen übrigen Ergebnissen, so dass die Wahrscheinlichkeitsreihe vom Primärsitz Ovar (54%) angeführt wurde.

In den allermeisten Fällen konnte also zwischen Pankreas- und Magenkarzinommetastasen nicht entschieden werden, aber es erfolgte auch keine Fehlinterpretation mit hoher, d.h. über 90%iger, Wahrscheinlichkeit.

Tab. 13: Markerspektren bei Pankreaskarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	49% Pankreas (38-61%) 46% Magen 38% Kolon [16 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	54% Magen (43-65%) 52% Kolon 39% Pankreas [12 Fälle]
Negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	85% Lunge (67-97%) 75% Pankreas [1 Fall]

4.2.6 Differenzierung von Nierenkarzinommetastasen

Bei den insgesamt 44 Metastasen von Nierenzellkarzinomen fand sich eine überraschend hohe Übereinstimmung des Tumormarkerspektrums. Der Vimentinnachweis war konstant positiv bei negativem Ergebnis aller übrigen Färbungen bis auf einen positiven Nachweis von CK20 in zwei Fällen und CK7 in 3 Fällen. Obwohl die Tumormarkerkombination keinen nierenspezifischen Marker enthält, wurde auf der Grundlage der Kombination eines positiven Vimentinnachweises bei negativem GCDFP und CK7 in 41 Fällen eine Zuordnungswahrscheinlichkeit von 99% berechnet. Eine Fehlinterpretation kam nicht vor. Bei positivem CK7-Nachweis konnte noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 75% mit dem Primärsitz des Tumors in der Niere gerechnet werden. Die vorkommenden Markerspektren sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Tab. 14: Markerspektren bei Nierenkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Negativ	negativ	positiv	Negativ (positiv)	negativ	negativ	negativ	99% Niere (96-100%) [41 Fälle]
Negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	75% Niere (66-82%) [3 Fälle]

Eine Abhängigkeit der Vorhersagewahrscheinlichkeit vom Differenzierungsgrad war nicht erkennbar. In der Gruppe der untersuchten Nierenkarzinommetastasen fanden sich ganz überwiegend G2-Tumoren (34) bei 10 G3-Tumoren.

4.2.7 Differenzierung von Lungenkarzinommetastasen

Bei der Differenzierung der insgesamt 45 Metastasen von Adenokarzinomen der Lunge war die Verwendung des hochspezifischen SurfactantA-Nachweises von entscheidender Bedeutung. Ein positives Färbeergebnis fand sich in 18 Fällen (40%). Damit konnte unabhängig von den übrigen Ergebnissen mit einer Wahrscheinlichkeit von 97% die Zuordnung zum Primärorgan Lunge erfolgen. Konnte dagegen Surfactant A nicht nachgewiesen werden, so war eine sichere Zuordnung nur noch in in weiteren 5 Fällen möglich. Die Kombination eines positiven Färbeergebnisses für Vimentin und CEA bei negativem CK20 war dafür ausschlaggebend. Insgesamt konnte also in etwa der Hälfte der Lungenkarzinommetastasen (51%) mit über 90%iger Sicherheit der zutreffende Primärtumor angegeben werden. Die vier Fehlinterpretationen mit ebenfalls über 90%iger Wahrscheinlichkeit betrafen in 2 Fällen die Niere (94%) bei ausschließlich negativen Färbeergebnissen, das Kolon (96%) für die Kombination CEA „positiv“, CK20 „positiv“ und CK7 „negativ“ und die Mamma für den Nachweis von GCDFP-15 „positiv“. Die übrigen Fehlinterpretationen erfolgten mit geringerer Wahrscheinlichkeit und sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tab. 15: Markerspektren bei Lungenkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
						positiv	97% Lunge (91-100%) [18 Fälle]
Negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	94% Lunge (78-100%) [5 Fälle]

Tab. 16: Atypische Markerspektren bei Lungenkarzinommetastasen

GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	wahrscheinlicher Primärtumor
Positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	91% Mamma (80-98%) [1 Fall]
Negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	96% Kolon (90-99%) [1 Fall]
Negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	88% Kolon (81-94%) [1 Fall]
Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	94% Niere (88-98%) [2 Fälle]
Negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	54% Ovar (45-62%) [1 Fall]
Negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	49% Pankreas (49-65%) [11 Fälle]
Negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	54% Magen (43-65%) [3 Fälle]

Betrachtet man die Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Abgrenzbarkeit der Lungenkarzinommetastasen, so ist festzustellen, dass der Anteil zutreffender Diagnosen unter den besser differenzierten Metastasen deutlich höher ist. Es konnten mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit 11 von 18 G2-Tumoren (61%) und 12 von 27 G3-Tumoren (44%) ihrem Primärtumor zugeordnet werden. Die 5 Metastasen, die bei fehlendem Surfactant-Nachweis auf der Grundlage des o.g. Markerspektrums zugeordnet werden konnten, gehörten alle zur Gruppe der G3-Tumoren. Der Anteil der Surfactant A-positiven Metastasen ist also unter den schlechter differenzierten Fällen noch geringer: 7 von 27 G3-Tumoren (26%) (Tab.17).

Tab. 17: Diagnosewahrscheinlichkeit von Lungenadenokarzinomen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

Differenzierungsgrad	Anzahl	>=90% Diagnosewahrscheinlichkeit Lungenadenokarzinom
G 2	18	11 (61%)
G 3	27	12 (44%)

4.2.8 Zusammenfassende Darstellung der mit hoher Wahrscheinlichkeit abgrenzbaren Metastasen

Von einer ausreichend hohen Diagnosesicherheit wurde hier bei einer erreichten Zuordnungswahrscheinlichkeit von über 90% ausgegangen. Im gesamten Material fanden sich insgesamt 9 Fehlinterpretationen (3%) in diesem Bereich. Darunter waren zum einen Metastasen vertreten, bei denen eine Abgrenzung generell nur zu einem geringen Teil möglich war, wie beim Ovarialkarzinom, oder gar nicht gelang, wie beim Magenkarzinom. Zum anderen waren Lungenadenokarzinommetastasen in 4 Fällen vertreten, die sich abgesehen vom hochspezifischen Surfactant A-Nachweis durch sonst stark heterogene Markerspektren auszeichneten. Insgesamt konnten 143 Metastasen (46%) mit hoher Sicherheit ihrem Primärtumor zugeordnet werden. Darunter war der Anteil der Nieren- und Kolonkarzinommetastasen mit 93% und 78% am höchsten, gefolgt von Lungen-, Mamma- und Ovarialkarzinommetastasen mit jeweils 51%, 46% und 32%. Für Magen- und Pankreaskarzinommetastasen war eine sichere Zuordnung nicht möglich.

Unter der Annahme einer relevanten Aussage ab 90% Zuordnungswahrscheinlichkeit bleibt die Sensitivität des vorgestellten statistischen Verfahrens mit 46% recht gering bei hoher Spezifität von 95%.

Tab. 18: Zusammenfassung der Metastasen mit über 90%iger Zuordnungswahrscheinlichkeit

Metastasenursprung	N	Zutreffende Diagnose mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit	Fehlinterpretation mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit
Mammakarzinom	73	34 (46%)	0
Ovarialkarzinom	37	12 (32%)	3 (2xLunge, 1xNiere)
Kolonkarzinom	42	33 (78%)	0
Magenkarzinom	41	0	2 (2xKolon)
Pankreaskarzinom	31	0	0
Nierenkarzinom	44	41 (93%)	0
Lungenadenokarzinom	45	23 (51%)	4 (1xMamma, 1xKolon, 2xNiere)

4.2.9 Vorhersagewahrscheinlichkeit für einen Primärtumor bei eingeschränkter Organauswahl

Auf dem diagnostischen Weg von der Metastase unbekannten Ursprungs zum wahrscheinlichsten Primärtumor kann bereits vom klinischen und histomorphologischen Aspekt her die Zahl der möglichen Primärtumoren eingeschränkt sein. Andererseits kann sich bei einem anamnestisch bekannten Krebsleiden die Frage ergeben, ob es sich bei einem neu entdeckten malignen Prozeß um einen metastatischen Herd oder einen primären Zweittumor handelt. Kommen also nur wenige Primärtumoren in Betracht, kann die Vorhersagewahrscheinlichkeit mit Hilfe des vorgestellten Verfahrens bei zunächst nicht sicher zu klassifizierenden Metastasen im allgemeinen gesteigert werden. Für die folgenden regional benachbarten Organe sollen die Differenzierungsmöglichkeiten exemplarisch dargestellt werden.

4.2.9.1 Primärlokalisation: Lunge oder Mamma?

Mammakarzinome metastasieren häufig in die Lunge, so dass die Entscheidung zwischen einer Mammakarzinommetastase und einem primären Lungenkarzinom relevant werden kann.

Bei uneingeschränkter Organauswahl ist auf der Grundlage des vorliegenden Datenmaterials eine klare Abgrenzung von Lungenkarzinommetastasen vor allem bei nachgewiesenem Surfactant A gegeben (in 18 Fällen) sowie in 5 weiteren Fällen basierend auf der Kombination CK20 „negativ“, Vimentin „positiv“ und CEA „positiv“. Geht es nun lediglich um die Abgrenzung gegenüber Mammakarzinommetastasen kann in den allermeisten verbliebenen Fällen eine klare Zuordnung, d.h. mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90%, erfolgen. Die Differenzierung gegen Mammakarzinommetastasen ergibt sich aus einem jeweils negativen Färbeergebnis für GCDFP-15 und ER in Kombination mit einem positiven Ergebnis für CEA oder CK20. In 5 Fällen werden Lungenkarzinommetastasen fälschlich dem Primärorgan Mamma zugeordnet, wenn ausschließlich negative Färbeergebnisse vorliegen bzw. wenn lediglich CK7 oder CK7 in Kombination mit Vimentin nachgewiesen wurde. In einem Fall kann zwischen Lunge und Mamma als Primärorgan nicht entschieden werden, denn beide Zuordnungswahrscheinlichkeiten liegen knapp über 90%.

Tab. 19: Differenzierung der Lungenmetastasen von Mammakarzinometastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
18							positiv	97% Lunge (91-100%)
5	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	94% Lunge (81-100%)
11	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	95% Lunge (86-99%)
3	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	95% Lunge (86-99%)
1	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	93 % Lunge (83-98%)
1	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	93% Lunge (83-98%)

Tab. 20: Fehlerhafte Zuordnung von Lungenmetastasen zum Mammakarzinom

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
2	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	93% Mamma (83-98%)
2	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	85% Mamma (73-93%)
1	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Mamma (87-100%)
1	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	92% Lunge (85-95%) 91% Mamma (80-98%)

Ausgehend von den Mammakarzinometastasen waren bereits 34 von 73 bei uneingeschränkter Organauswahl mit hoher Wahrscheinlichkeit von über 90% richtig zuzuordnen. Bei der ausschließlichen Gegenüberstellung mit Lungenkarzinometastasen konnte für die meisten verbliebenen Fälle eine ebenso hohe Zuordnungswahrscheinlichkeit erreicht werden. Neben dem Nachweis von GCDFP-15 war dabei ein positiver Estrogenrezeptor bedeutsam. Ein positiver CK7-Nachweis in Verbindung mit sonst negativen Ergebnissen oder mit einem positiven Vimentinnachweis unterstützte ebenfalls die Diagnose Mammakarzinom gegen Lungenkarzinom. In 2 Fällen wurde fälschlich die Entscheidung für das Lungenkarzinom gefällt auf der Grundlage eines positiven CEA-Nachweises bei sonst negativen Ergebnissen bzw. in Kombination mit CK7 „positiv“ und negativen übrigen Ergebnissen.

Tab. 21 Differenzierung der Mammakarzinommetastasen von Lungenkarzinommetastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
34	positiv							91% Mamma (80-98%)
6	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	97% Mamma (88-100%)
19	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Mamma (87-100%)
12	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	93% Mamma (83-98%)

Tab. 22: Fehlerhafte Zuordnung von Mammakarzinommetastasen zum Lungenkarzinom

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
1	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	93% Lunge (83-100%)
1	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	97% Lunge (86-99%)

4.2.9.2 Primärlokalisierung: Kolon oder Ovar?

Unter den metastatischen Absiedlungen im Ovar finden sich häufig Metastasen eines Kolonkarzinoms. Der entscheidende Marker für die Unterscheidung von Ovarial- und Kolonkarzinommetastasen ist das CEA. Da Kolonkarzinommetastasen konstant CEA-positiv waren, fällt die Entscheidung bei gleichzeitig negativem Estrogenrezeptor hier in jedem Fall mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% für das primäre Kolonkarzinom. Andererseits bedeutet ein negatives Ergebnis für CEA bei Ovarialkarzinommetastasen immer eine Zuordnungswahrscheinlichkeit von 99% für das primäre Ovarialkarzinom. Problematisch sind nur die 3 CEA-positiven Ovarialkarzinommetastasen. Darunter tritt in einem Fall ein positiver Estrogenrezeptor hinzu, so dass eine korrekte Zuordnung mit einer Wahrscheinlichkeit von 98% erfolgen kann. In den beiden verbliebenen Fällen ist der positive CEA-Nachweis kombiniert mit einem ebenfalls positiven Ergebnis für CK7 und Vimentin, so dass hier keine Entscheidung getroffen werden kann. Die Zuordnungswahrscheinlichkeit beträgt 99% für das Kolonkarzinom (CEA „positiv“) und 98% für das Ovarialkarzinom (Vimentin „positiv“). Mit Ausnahme dieser beiden genannten Fälle können also sämtliche übrigen Ovarialkarzinommetastasen und Kolonkarzinommetastasen sicher voneinander unterschieden werden.

Tab. 23: Differenzierung von Ovarialkarzinommetastasen gegen Kolonkarzinommetastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
34	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	99% Ovar (97-100%)
1	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	98% Ovar (92-100%)
2	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	99% Kolon (96-100%)/ 98% Ovar (92-100%)

Tab. 24: Differenzierung von Kolonkarzinommetastasen gegen Ovarialkarzinommetastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
42		positiv				negativ		99% Kolon (96-100%)

4.2.9.3 Primärlokalisierung: Lunge oder Kolon?

Diese Frage könnte sich aufgrund der Tatsache stellen, dass die Lunge ein häufiger Metastasierungsort des Kolonkarzinoms ist.

Bei 33 von 42 Kolonkarzinommetastasen kann aufgrund des Tumormarkerspektrums bereits ohne Einschränkung der Organ Auswahl mit hoher Wahrscheinlichkeit (96%) der Primärtumor identifiziert werden. Bei allein gewünschter Abgrenzung gegen ein Adenokarzinom der Lunge können mit einer Ausnahme alle Kolonkarzinommetastasen mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Da CEA in jedem Falle nachweisbar war, ging es hier vor allem um den zusätzlichen bzw. fehlenden Nachweis von CK20 und CK7. Ein positives Ergebnis für CK7 bei sonst negativen Färbeargebnissen führte zu der einzigen Fehlinterpretation in dieser Metastasengruppe. Wurde dagegen zusätzlich ein positiver CK20-Nachweis geführt, so fiel die Entscheidung trotz ebenfalls positivem CK7 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das primäre Kolonkarzinom. Bedeutsam war hier die Kombination CK20 „positiv“ mit GCDFP-15 „negativ“.

Tab. 25: Differenzierung von Kolonkarzinommetastasen gegen Lungenkarzinommetastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant A	Primärorgan
33	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	99% Kolon (95-100%)
4	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	99% Kolon (95-100%)
4	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	96% Kolon (91-99%)
1	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Lunge (91-99%)

Unter den 27 Surfactant-negativen Lungenkarzinommetastasen war ein negatives Ergebnis für CEA entscheidend für die sichere Zuordnung zum Primärorgan Lunge. War CEA dagegen nachweisbar, so gewann die Kombination mit CK7 „positiv“

Bedeutung für die Abgrenzung von Kolonkarzinommetastasen. Die 5 Lungenkarzinommetastasen, die fälschlich dem Kolonkarzinom zugeordnet wurden, waren gekennzeichnet durch ein positives Färbeergebnis für CEA in Kombination mit negativen übrigen Ergebnissen (in einem Fall) oder in Kombination mit CK20 „positiv“ und CK7 „positiv“/ „negativ“. Die einzige Lungenkarzinommetastase, die neben CEA auch GCDFP-15 exprimiert hatte, konnte nicht sicher zugeordnet werden.

Tab. 26: Differenzierung von Lungenkarzinommetastasen gegen Kolonkarzinommetastasen

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	wahrscheinlicher Primärtumor
18							positiv	97% Lunge (91-100%)
2	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	95% Lunge (82-100%)
2	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Lunge (91-99%)
1	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Lunge (91-99%)
11	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Lunge (91-99%)
5	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	96% Lunge (91-99%)

Tab. 27: Fehlerhafte Zuordnung von Lungenkarzinommetastasen zum Kolonkarzinom

n	GCDFP	CEA	Vimentin	CK20	CK7	ER	Surfactant	Primärorgan
1	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	91% Kolon (85-96%) 88% Lunge (80-93%)
1	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	99% Kolon (95-100%)
3	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	96% Kolon (91-99%)
1	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	99% Kolon (95-100)

4.3 VALIDITÄT DER UNTERSUCHTEN TUMORMARKER

Im folgenden soll die Bedeutung der einzelnen verwendeten Tumormarker bzw. bestimmter häufiger Kombinationen für die Diagnosefindung dargestellt werden.

4.3.1 GCDFP-15

GCDFP-15 erweist sich hier wie erwartet als hochspezifischer Marker für das Mammakarzinom. Lediglich in einem Fall wurde eine GCDFP-15-Positivität außerhalb von Mammakarzinommetastasen vorgefunden. Dabei handelte es sich um eine Metastase pulmonaler Herkunft. Allerdings war das Färbeergebnis nur in 42% der

Mammakarzinommetastasen positiv und erlaubte damit eine mindestens 91%ige Zuordnungswahrscheinlichkeit für das Mammakarzinom. In Kombination mit einem positiven Estrogenrezeptorstatus, einem positiven CK7-Nachweis oder mit einem negativen Färbeergebnis für CEA konnte eine weitere Steigerung der Zuordnungswahrscheinlichkeit erreicht werden (Tab.28).

Tab. 28: Verwendung des vorgestellten statistischen Verfahrens bei positivem GCDFP-15-Nachweis einschl. relevanter Kombinationen

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit für das Mammakarzinom
31	GCDFP-15 „positiv“	91%
18	GCDFP „positiv“/ ER „positiv“	95%
27	GCDFP-15 „positiv“/ CK7 „positiv“	97%
16	GCDFP-15 „positiv“/ CEA „negativ“	94%

Zur Ermittlung der Spezifität und Sensitivität des GCDFP-15 für die Vorhersage eines primären Mammakarzinoms sind die jeweiligen Färbeergebnisse in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tab. 29: Vierfeldertest für GCDFP-15 bei der Vorhersage eines Mammakarzinoms

<div style="text-align: center;"> GCDFP-Positivität <div style="border-top: 1px solid black; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; height: 10px; margin: 5px 0;"></div> Karzinomtyp </div>	GCDFP-15 „positiv“	GCDFP-15 „negativ“
Mammakarzinom	31 [richtig positiv]	42 [falsch negativ]
Andere Karzinome	1 [falsch positiv]	239 [richtig negativ]

Daraus ergibt sich zwar eine relativ geringe Sensitivität von 0,42 bei allerdings hoher Spezifität von 0,99 und einem positiven prädiktiven Wert von 0,97. Damit kommt dem GCDFP-15 eine herausragende Bedeutung bei der Abgrenzung von Mammakarzinommetastasen gegenüber anderen Adenokarzinomen bzw. deren metastastischen Absiedlungen zu.

4.3.2 Estrogenrezeptor

Ein positiver Estrogenrezeptornachweis wurde in 27 von 73 (37%) Mammakarzinommetastasen sowie in 20 von 37 (54%) Ovarialkarzinommetastasen geführt. Sekundäre Tumoren aus allen anderen Primärorten boten jeweils ein negatives Färbeergebnis mit Ausnahme einer Lungenkarzinommetastase. Ein positiver Estrogenrezeptor war also nahezu in jedem Fall mit einem Primärtumor aus Mamma oder Ovar assoziiert. Zur weiteren Differenzierung gewinnt die Kombination mit einem positiven Färbeergebnis für GCDFP-15 und CEA oder mit einem negativen Vimentinnachweis für das Mammakarzinom, die Kombination mit einem positiven Vimentin- und CK7-nachweis bei sonst negativen Ergebnissen für das primäre Ovarialkarzinom an Bedeutung.

Tab. 30: Bedeutung eines positiven Estrogenrezeptors einschließlich wesentlicher Kombinationen

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit zum Primärorgan
48	ER „positiv“	58% Ovar/ 39% Mamma
18	ER „positiv“/GCDFP-15 „positiv“	95% Mamma
30	ER „positiv“/GCDFP-15 „negativ“	77% Ovar
18	ER „positiv“/CEA „positiv“	77% Mamma
3	ER „positiv“/CK20 „positiv“	88% Ovar
12	ER „positiv“/ Vimentin „positiv“	96% Ovar

4.3.3 Vimentin

Als unspezifischer Tumormarker war Vimentin abgesehen von Magen- und Kolonkarzinommetastasen in allen anderen untersuchten Metastasen mehr oder weniger häufig nachweisbar. Von den Tumoren des Magen-Darm-Traktes war lediglich eine Pankreaskarzinommetastase Vimentin-positiv. Eine regelmäßige Vimentinexpression war nur bei Nierenkarzinomen zu beobachten. Die gute Abgrenzbarkeit der Nierenkarzinommetastasen beruht allerdings nicht auf dem alleinigen Vimentinnachweis, sondern vielmehr auf der Kombination mit den übrigen negativen Färbeergebnissen.

Ein positiver Vimentinnachweis in 22 von 37 (59%) Ovarialkarzinommetastasen gewinnt in Kombination mit einem positiven Färbeergebnis für den Estrogenrezeptor an differentialdiagnostischer Bedeutung. Eine Vimentinexpression bei

Mammakarzinommetastasen (in 14 Fällen) war dagegen in jedem Fall assoziiert mit einem negativen Estrogenrezeptorstatus, nur in 2 Fällen mit einem positiven Färbeergebnis für GCDFP-15. Außerdem überwogen in dieser Gruppe die weniger differenzierten Tumoren (11 von 33 G3-Tumoren versus 3 von 37 G2-Tumoren). Bei den Ovarialkarzinommetastasen war eine Beziehung zwischen Vimentinexpression und Differenzierungsgrad bzw. Estrogenrezeptorstatus nicht erkennbar.

Der Nachweis des Vimentins dient im vorliegenden Datenmaterial also vor allem der Abgrenzung von Nierenzellkarzinomen, von Ovarialkarzinomen und von Surfactant A-negativen Lungenkarzinommetastasen, und zwar ausschließlich in der Kombination mit anderen Markern.

Tab. 31: Bedeutung eines Vimentinnachweises einschl. wesentlicher Kombinationsmöglichkeiten

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit Primärtumor
93	Vimentin „positiv“	51% Niere
12	Vimentin „positiv“/ER „positiv“	96% Ovar
42	Vimentin „positiv“/CK7 „negativ“	98% Niere
7	Vimentin „positiv“/CK20 „negativ“/CEA „positiv“	94% Lunge

4.3.4 CEA

CEA stellt sich hier als wenig spezifischer Marker für Tumoren gastrointestinalen Ursprungs dar. Sämtliche Kolonkarzinommetastasen zeigten ein positives Färbeergebnis. Die Pankreaskarzinommetastasen waren in 29 Fällen (94%) CEA-positiv; Karzinommetastasen, die primär aus dem Magen stammten, in 36 Fällen (88%). Damit beträgt hier die Sensitivität dieses Markers für einen gastrointestinalen Ursprung 0,94. Allerdings bleibt die Spezifität gering infolge eines beträchtlichen Anteils von CEA-positiven Metastasen ausgehend von 21 Mammakarzinomen (29%), von 3 Ovarialkarzinomen (8%) und 36 Lungenkarzinomen (80%). Unter den Nierenzellkarzinommetastasen befand sich kein CEA-positiver Fall. Es ergibt sich daraus eine Spezifität für gastrointestinale Tumoren von 0,70. Als Einzelmarker spielt das CEA daher differentialdiagnostisch nur eine geringe Rolle. Es gewinnt an Bedeutung in Kombination mit CK20 bei fehlendem Nachweis von CK7 für das Kolonkarzinom sowie für GCDFP-15-negative Mammakarzinome in Verbindung mit einem positiven Estrogenrezeptornachweis und einem negativem Ergebnis für CK20 und Surfactant A.

Tab. 32: Bedeutung eines positiven CEA-Nachweises einschl. wesentlicher Kombinationsmöglichkeiten

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit für Primärtumor
165	CEA „positiv“	27% Kolon/ 23% Magen/ 23% Lunge/ 19% Pankreas/7% Mamma/1%Ovar
48	CEA „positiv“/CK7 „negativ“	80% Kolon
35	CEA „positiv“/CK20 „positiv“/ CK7 „negativ“	96% Kolon
16	CEA „positiv“/ER „positiv“/ Surfactant „negativ“/CK20 „negativ“	94% Mamma
7	CEA „positiv“/ Vimentin „positiv“/ CK20 „negativ“	94% Lunge

4.3.5 Cytokeratin 20

Cytokeratin 20 wurde ganz überwiegend in den Metastasen von gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen. Bei den Kolonkarzinommetastasen in 37 Fällen (88%), bei Magenkarzinommetastasen in 22 Fällen (54%) und in 13 Pankreaskarzinommetastasen (42%). Ein regelmäßiges negatives Ergebnis fand sich nur in der Gruppe der Mammakarzinommetastasen. Andere Metastasen, deren Primärtumoren außerhalb des Gastrointestinaltraktes lagen, zeigten zu einem geringen Teil ein positives Farbeergebnis: Metastasen von Ovarialkarzinomen in 4 Fällen (11%), von Lungenkarzinomen in 6 Fällen (13%) und von Nierenkarzinomen in 2 Fällen (4%). CK20 weist also mit einer geringen Sensitivität (0,63) aber relativ hohen Spezifität (0,94) auf einen Primärtumor im gastrointestinalen Bereich hin. Für die weitere Differenzierung von Kolonkarzinommetastasen werden Kombinationen des CK20 mit CK7 und CEA bedeutsam. In einem Fall läßt sich auch eine CK20-positive Ovarialkarzinommetastase abgrenzen bei gleichzeitig positivem CK7 und negativen Ergebnissen für CEA und GCDFP-15.

Tab. 33: Bedeutung eines CK20-Nachweises einschl. wesentlicher Kombinationsmöglichkeiten

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit für Primärtumor
84	CK20 „positiv“	44% Kolon, 26% Magen, 16% Pankreas
38	CK20 „positiv“/ CK7 „negativ“	86% Kolon
35	CK20 „positiv“/ CK7 „negativ“/ CEA „positiv“	96% Kolon
39	CK20, CK7 „positiv“/CEA, GCDFP-15 „negativ“	88% Ovar

4.3.6 Cytokeratin 7

Die Färbeergebnisse für CK7 waren bei Pankreaskarzinommetastasen ausschließlich positiv. Ganz überwiegend positive Ergebnisse fanden sich auch bei den Lungen-, Magen-, Mamma- und Ovarialkarzinommetastasen. Im Gegensatz dazu konnte bei den Nierenkarzinommetastasen nur in 3 Fällen eine CK7-Expression nachgewiesen werden, bei sonst negativem Ergebnis. In ähnlicher Weise waren auch Kolonkarzinommetastasen bis auf 5 Ausnahmen CK7-negativ. Die besondere diagnostische Bedeutung des CK7 liegt also weniger in seiner organspezifischen Expression, als in der fehlenden Expression bei Nieren- und Kolongewebe. Da sich das übrige Markerspektrum bei Nieren- und Kolonkarzinommetastasen komplett unterscheidet, entstehen hier keine differentialdiagnostischen Probleme. Bei negativem Färbeergebnis für CK7 kann also in Abhängigkeit von den übrigen Ergebnissen mit jeweils hoher Zuordnungswahrscheinlichkeit entweder von einem primären Kolon- oder Nierenkarzinom ausgegangen werden. Ein positives Ergebnis für CK7 in Verbindung einem ER- und Vimentinnachweis erhält seine Bedeutung für die Differenzierung von Ovarialkarzinommetastasen.

Tab. 34: Bedeutung des CK7-Nachweises einschl. wesentlicher Kombinationsmöglichkeiten

n	Markerspektren	Zuordnungswahrscheinlichkeit für Primärtumor
219	CK7 „positiv“	22% Lunge, 20% Ovar, 20% Magen, 19% Mamma, 17% Pankreas
12	CK7 „positiv“/ER „positiv“/ Vimentin „positiv“	96% Ovar
94	CK7 „negativ“	45% Niere/ 41% Kolon
42	CK7 „negativ“/Vimentin „positiv“	98% Niere
35	CK7 „negativ“/CEA „positiv“/ CK20 „positiv“	96% Kolon
42	CK7 „negativ“/CEA „positiv“/ ER, Surfactant, Vimentin, GCDFP- 15, CK20 „negativ“	49% Pankreas, 37% Magen

4.3.7 Surfactant A

Surfactant A wurde ausschließlich in den Metastasen von Lungenadenokarzinomen nachgewiesen, in 18 von 45 getesteten Fällen. Die erwartete hohe Spezifität wurde bestätigt (1,00). Die Sensitivität war mit 0,40 allerdings gering, so dass ein beträchtlicher Anteil SurfactantA-negativer Lungentumoren aufgrund fehlender spezifischer Markerkonstellationen nicht differenziert werden konnte. Die Zuordnungswahrscheinlichkeit auf der Grundlage eines positiven Surfactant A-Nachweises beträgt für das Lungenadenokarzinom 98%.

4.4 ZUR MÖGLICHKEIT DER VORHERSAGE DES PRIMÄRTUMORS BEIM CUP-SYNDROM AUF DER GRUNDLAGE KLINISCH-EPIDEMIOLOGISCHER DATEN

Betrachtet man die Metastase im Rahmen eines CUP-Syndroms als Bestandteil eines bestimmten Metastasierungsmusters des unbekannten Primärtumors, der aufgrund seiner Organlokalisation, seines histologischen Typs oder seines Malignitätsgrades ein charakteristisches Metastasierungsverhalten aufweist, so wären Rückschlüsse auf den wahrscheinlichen Sitz des Primärtumors vorstellbar. Zum anderen wird man allgemein häufig vorkommende Tumoren eher als Ursprung der Metastase in Betracht ziehen. Also spielt neben den Metastasierungseigenschaften des Primärtumors auch die Tumorzinzidenz, die wiederum alters- und geschlechtsabhängige sowie regionale Unterschiede aufweist, eine Rolle. Im folgenden sollen die wichtigsten Faktoren erläutert werden, die in ein statistisches Modell zur Vorhersage des Primärtumors beim CUP-Syndrom einfließen würden.

4.4.1 Mögliche Einflußfaktoren auf die Primärtumorwahrscheinlichkeit beim CUP-Syndrom

4.4.1.1 Epidemiologische Faktoren

Man unterscheidet für verschiedene Tumorarten bestimmte altersabhängige Inzidenzmuster. So treten Hodentumoren überwiegend im jungen Erwachsenenalter auf mit einem Gipfel um das 30. Lebensjahr. Eine U-förmige Altersverteilung ist typisch für Leukämien mit 2 Gipfeln - im jugendlichen und im höheren Lebensalter. Ein nahezu exponentieller Anstieg der Inzidenz zeigt sich nach dem 40. Lebensjahr für Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinome.

Abgesehen von den allgemein häufigen Tumoren der Geschlechtsorgane besteht zum Teil ein Ungleichgewicht der Tumorzinzidenzen von Männern und Frauen. Ungleich häufiger als Frauen sind die Männer vom Bronchialkarzinom oder von Kopf-/Halstumoren betroffen. Der Anteil der weiblichen Patienten überwiegt bei Schilddrüsenkarzinomen oder Leukämien [HÖLZEL, KLAMERT, SCHMIDT 1996].

Geografische und ethnische Einflüsse bedingen z.T. gravierende Unterschiede der Tumorzinzidenzen. Anders als in Mitteleuropa zählen beispielsweise unter japanischen Männern Magenkarzinome mit einer Inzidenz von 73,6/100.000 zu den häufigsten. Dagegen sind die hier häufigen Prostatakarzinome (Dänemark : 29,9/100.000) im asiatischen Raum selten (China: 1,7/100.000) [PARKIN et al., 1993].

4.4.1.2 Lokalisation des Primärtumors und histologischer Tumortyp

Das haematogene Metastasierungsmuster ist zum einen abhängig von den anatomisch vorgegebenen Strukturen, wie bereits ausführlich beschrieben, wird aber auch von zusätzlichen Wechselbeziehungen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen des Wirtsorgans bestimmt. Als Beispiel sei das unterschiedliche Metastasierungsmuster bei kleinzelligem Bronchialkarzinom und Plattenepithelkarzinom der Lunge genannt. Bekanntlich metastasieren am häufigsten Prostatakarzinome ins Skelettsystem (überwiegend osteoblastische Metastasen), gefolgt von Karzinomen der Mamma, der Lunge, der Schilddrüse und der Niere. Die meisten cerebralen Metastasen entstammen Tumoren der Lunge (30-40%), der Mamma (15%) und kolorektalen Tumoren (15%) [NOLTENIUS,1987].

4.4.1.3 Klinisches Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Die Metastasierung ist bekanntlich ein kaskadenartig fortschreitender Prozeß. Jede neue Metastase kann zum Ausgangspunkt weiterer Absiedlungen werden und somit das Metastasierungsmuster verändern. Frühe Metastasen vieler Tumoren bevorzugen bestimmte Organe. Im Finalstadium sind dagegen multiple Organe befallen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Tumorzellen zunehmend unabhängiger werden von den Wachstumsbedingungen des Wirtsorgans. Tatsächlich produzieren Tumoren im fortgeschrittenen Stadium eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren [MENTER et al. 1992].

4.4.2 Das Metastasierungsverhalten beim CUP-Syndrom

Daten über das Metastasierungsverhalten bekannter Primärtumoren wären zahlreichen und groß angelegten Autopsiestudien zu entnehmen. Aus den regionalen Krebsregistern werden die aktuellen Tumorinzidenzen ersichtlich. Bevor jedoch dieses Datenmaterial auf das CUP-Syndrom übertragen und zur Bestimmung des wahrscheinlichen Sitzes des Primärtumors genutzt werden darf, muß die Frage geklärt werden, inwieweit sich die Primärtumoren im Rahmen eines CUP-Syndroms ähnlich verhalten wie die übrigen Tumoren. In der folgenden Übersicht sind dazu Ergebnisse bisheriger Studien zusammengestellt worden.

4.4.2.1 Die Hauptlokalisationen von Metastasen beim CUP-Syndrom

Als häufigste Erstmanifestationen eines CUP-Syndroms finden sich, wie in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt, vor allem Metastasen der Lymphknoten, der Lunge, der Knochen, des Gehirns und der Haut. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei der Zeitpunkt und das Ausmaß der Symptome einer Metastase (z.B. Knochenschmerzen) einerseits sowie eine gute diagnostische Zugänglichkeit

andererseits (z.B. Rundherd im Röntgen-Thorax). In diesem Zusammenhang sind möglicherweise auch die relativ häufigen Hautmetastasen zu betrachten, obwohl die Haut normalerweise ein eher seltener Metastasenort ist. Dagegen erscheint die Leber unterrepräsentiert, die sonst zu den häufigsten Zielorganen von Metastasen gehört.

Tab. 35: Metastasenlokalisationen beim CUP-Syndrom

	HOLMES und FOUTS 1970, N=686	SNEE und VYRAMUTHU 1985, N=319	LE CHEVALIER et al. 1988, N=255
Lymphknoten	17,0%	28%	37,1%
Lunge	12,6%	2,2%	18,5%
Knochen	15,7%	55%	12,6%
ZNS	9%	2,5%	9,6%
Haut	1,6%	3%	8,9%
Leber	10,5%		4,6%
Pleura	2,7%		2,3%
Magen			1,3%
Peritoneum	8,4%	7% (abdominale Masse)	1,3%
Darm	2,4%		
Sonstige	20,1%	2,3%	3,8%

4.4.2.2 Häufigste Lokalisation des Primärtumors

Nur zu einem geringen Teil (etwa 15-27%) gelingt es bei einem CUP-Syndrom, noch zu Lebzeiten des Patienten den Sitz des Primärtumors zu bestimmen. Ein wechselnd großer Teil der Fälle gelangt zur Autopsie. Aber auch hierbei bleibt ein erheblicher Teil weiter unentdeckt (identifizierte Primärtumoren: 27% bei JORDAN und SHILDT 1985 und DIDOLKAR 1977, 20% bei NYSTROM 1977). Am häufigsten findet sich der Primärtumor schließlich in der Lunge oder im Pankreas. Darüber sind sich die meisten Autoren einig (Siehe Tab. 36) Die üblicherweise häufig auftretenden Tumoren, wie Mamma-, Prostata- oder kolorektale Karzinome, spielen beim CUP-Syndrom nur eine untergeordnete Rolle. Es ist also von einer ungewöhnlichen Häufigkeitsverteilung bezüglich der bevorzugten Primärorgane auszugehen.

Tab. 36: Lokalisation des Primärtumors beim CUP-Syndrom

Primär-tumor	DIDOLKAR et al. 1977; N=71	NYSTROM et al. 1977; N=107	OSTEEN et al. 1977; N=67	STEWART et al. 1979, N=16	JORDAN und SHILDT, 1985; N=18	HAMILTON et al. 1986; N=38	LE CHEVALIER et al. 1988 N=255
Lunge	40%	18%	27%	25% (4)	27% (5)	37%	17%
Pankreas	6,5%	20%	9%	(1)	17% (3)	11%	26%
Magen	6,5%	8%	3%	(1)	11% (2)	11%	3%
Gallengang					11% (2)		
Ovar	3,9%	4%	7,5%			2,5%	3%
Colon	3,9%	10%	7,5%	(1)		5%	4%
Niere	5,2%	6%	3%			2,5%	4%
Prostata	6%	3%					3%
Mamma	4%	2%					<1%
Leber	3%	11%		(1)		5%	3%
Sonstige	21%	49%	43%	50%	34% (6)	26%	36%

Zum Vergleich sollen hier die altersstandardisierten Inzidenzen der am häufigsten vorkommenden Tumoren angeführt werden:

Tab. 37: Inzidenz häufiger Tumoren (Atlas der Krebsinzidenz in der DDR 1961-89, Möhner et al)

Frauen	altersstandardisierte Inzidenz pro 100.000, 1980-1989	Männer	altersstandardisierte Inzidenz pro 100.000, 1980-1989
1. Mamma	45,8	1. Lunge	60,2
2. Uterus	36,9	2. Magen	22,7
3. Kolon	12,8	3. Prostata	21,9
4. Magen	11,3	4. Rektum	15,2
5. Rektum	10,2	5. Kolon	13,8

4.4.2.3 Metastasenmuster beim CUP-Syndrom

In diesem Zusammenhang soll auf die bereits oben zitierte Studie von NYSTROM et al. (1977) hingewiesen werden, die gezeigt hat, dass die schließlich (zumeist autoptisch) entdeckten Primärtumoren im Rahmen eines CUP-Syndroms ein atypisches Metastasierungsverhalten aufweisen. Auch LE CHEVALIER berichtete 1988 über ein beim CUP-Syndrom auftretendes unerwartetes Metastasenmuster bei 255 gesicherten Primärtumoren. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die von NYSTROM gefundenen Metastasenorte im Rahmen eines CUP-Syndroms im Vergleich zu einer Literaturübersicht über Metastasenorte bekannter Primärtumoren von GILBERT und KAGAN 1976. Dabei treten zum Teil deutliche Diskrepanzen auf, insbesondere bei den Knochenmetastasen von Lungen- und Prostatakarzinomen.

Tab. 38: Prozentuale Organbeteiligung für Metastasen bei NYSTROM et al.(1977) [A] versus Literaturübersicht (GILBERT und KAGAN 1976) [B]

Primärtumor	Knochen		Lunge		Leber		Gehirn	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Lunge	4	30-50	90	34	36	30-50	21	15-30
Mamma	33	50-85	66	60	66	45-60	33	15-25
Schilddrüse	0	39	100	65	50	60	0	1
Pankreas	28	5-10	31	25-40	72	50-70	3	1-4
Leber	31	8	19	20	100	-	6	0
Colon	13	5-10	40	25-40	87	71	0	1
Magen	9	5-10	18	20-30	36	35-50	9	1-4
Niere	66	30-50	77	50-75	33	35-40	0	7-8
Ovar	0	2-6	25	10	25	10-15	0	1
Prostata	25	50-75	75	13-53	50	13	25	2

Zusammenfassend muß festgestellt werden, dass auf der Grundlage der zur Verfügung stehenden Studienergebnisse die bisherigen Kenntnisse über Häufigkeit und Metastasierungsmuster bekannter Primärtumoren nicht unkritisch bei der Suche nach einem Primärtumor im Rahmen eines CUP-Syndroms anzuwenden sind. Andererseits sind die verfügbaren Daten über die Häufigkeit und das Metastasierungsverhalten von CUP-Tumoren für das vorgestellte statistische Verfahren unzureichend bzw. so heterogen, dass die Ergebnisse sehr stark von den ausgewählten Referenzdaten beeinflusst würden.

5 Diskussion

5.1 DISKUSSION DER AUFGABENSTELLUNG

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, bei der Diagnostik des CUP-Syndroms eine Orientierungshilfe zu liefern. Die Diagnosestellung eines metastatischen Herdes bei unbekanntem Primärtumor führt oft zu einer Vielzahl von zum Teil langwierigen, kostenintensiven und für den Patienten belastenden Folgeuntersuchungen unter Ausschöpfung der heutigen endoskopischen und radiologischen Möglichkeiten. Häufig bleibt der Primärtumor dennoch unerkannt.

Vom Pathologen wird heute gefordert, den Ursprung der Metastase möglichst genau zu bestimmen. Dabei geht es vor allem um die frühzeitige Erkennung von potentiell kurablen Tumoren oder auch solchen, die prinzipiell einer palliativen Therapie zugänglich wären. Der Immunhistologie kommt dabei ein ganz entscheidender Stellenwert zu. Ging es in den 80er Jahren noch prinzipiell um die immunhistologische Differenzierung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom bzw. um die Zuordnung zur Gruppe der Karzinome, Lymphome oder Sarkome [ALTMANNSSBERGER et al.1984], so können heute weit speziellere Problemstellungen gelöst werden. GAMBLE et al. (1993) untersuchten mit einem Panel von 5 Tumormarkern 100 Fälle von Adenokarzinommetastasen bei bekanntem Primärtumor. Es gelang für 70% der Tumoren bei Männern und für 54% der Fälle bei Frauen mittels immunhistologischer Färbungen den Sitz des Primärtumors in der Mamma, dem Gastrointestinaltrakt, dem weiblichen Genitale, der Lunge, der Prostata und der Schilddrüse zu bestimmen. Dabei wurde eine Spezifität zwischen 68% (Mamma) bis 98% (Prostata) und 100% (Schilddrüse) erreicht, bei allerdings zum Teil nur geringer Sensitivität. BROWN et al. führten 1996 eine retrospektive immunhistologische Untersuchung von 128 metastatischen nicht-muzinösen Adenokarzinomen durch. Mit einem Panel von 4 Tumormarkern (CEA, CA 19-9, CA125, BCA 225) war in 66% der Fälle eine Zuordnung zum Primärtumor in Kolon, Mamma, Lunge, Ovar oder oberer Gastrointestinaltrakt möglich.

Die Grundlage für das hier vorgestellte statistische Verfahren sollten zunächst die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse von Adenokarzinommetastasen sein, um damit Wahrscheinlichkeitsangaben für die entsprechenden Primärtumoren aufzeigen zu können. Es wurden ausschließlich (nichtmuzinöse) Adenokarzinome betrachtet, die mit etwa 60% den größten Anteil der CUP-Tumoren ausmachen. Zudem blieben seltene bzw. selten im Rahmen eines CUP-Syndroms vorkommende Tumoren ausgeschlossen. Wenn man berücksichtigt, dass eine sinnvolle Diagnostik für den Patienten die Möglichkeit einer therapeutischen Konsequenz beinhalten sollte, so muß hier einschränkend festgestellt werden, dass die Behandlungserfolge bei den meisten metastasierenden Adenokarzinomen besonders unbefriedigend sind. Nur wenige sprechen auf eine systemische Chemotherapie an, wie das Mamma- oder Ovarialkarzinom. Es bleibt zu hoffen, dass sich bald auch verbesserte spezifische

Behandlungsstrategien für Adenokarzinome des Gastrointestinaltraktes oder der Lunge etablieren werden. Damit wird die Kenntnis der Primärlokalisation dieser Tumoren erst klinisch bedeutsam, indem entsprechend zugeschnittene Therapien zur Anwendung kommen können.

Stehen für einzelne Primärtumoren hochspezifische Marker zur Verfügung, wie z.B. Antikörper gegen PSA beim Prostatakarzinom oder Surfactant A beim Lungenadenokarzinom, so ist die Diagnose bei positivem Färbeergebnis unproblematisch. Bei dem vorgestellten statistischen Verfahren geht es daher vorrangig um bestimmte Markerkombinationen, die bei fehlendem oder unzureichend sensitivem hochspezifischen Einzelmarker bei geringstem Zeitaufwand Hinweise auf den wahrscheinlichsten Primärtumor liefern sollen. Es ist anzunehmen, dass beim CUP-Syndrom die weniger differenzierten Tumoren überwiegen werden; also gerade diejenigen, bei denen der Nachweis hochspezifischer Tumormarker und damit die sichere Zuordnung meist nicht mehr gelingt. Zur Lösung dieses Problems ist die Auffindung typischer Markerprofile von entscheidender Bedeutung. Eine Aufarbeitung mit mathematisch-statistischen Mitteln, wie zum Beispiel mit dem hier dargestellten Verfahren, erscheint daher unumgänglich.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den histochemischen Färbeergebnissen aus dem Routineuntersuchungsmaterial, d.h. von Metastasen bekannter Primärtumoren. Die starke Inhomogenität bezüglich des anatomischen Sitzes der Primärtumoren stellt sicherlich auch ein Problem dar. Die angenommene Gleichverteilung durch Einführung einer der Häufigkeit entsprechenden Wichtung der Fälle führt zwangsläufig zu einer Überbewertung seltener Markerprofile. Dies sollte vor der praktischen Anwendung berücksichtigt werden. Das vorgeschlagene Verfahren kann jedoch beliebig durch laborspezifische Markerkombinationen und Färbeergebnisse erweitert werden. Auf diese Weise wird mit wachsender Datenbasis die Aussagekraft bzw. der praktische Nutzen des Verfahrens entsprechend zunehmen.

Ergänzend zu den immunhistologischen Daten sollte untersucht werden, ob auch klinische und epidemiologische Informationen in ein statistisches Modell integriert werden können, um die Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Primärtumoren beim CUP-Syndrom zu erhöhen. Dabei sollten die geschlechts- und altersabhängigen Tumorzinidenzen sowie die tumorspezifischen Metastasierungsmuster berücksichtigt werden. Auf diese Weise könnten bei einem Patienten mit CUP-Syndrom zusätzlich zum Tumormarkerspektrum Angaben wie Lebensalter, Geschlecht oder Metastasenlokalisation statistisch verwertet werden. In der Literatur hat es bereits 1984 von BASSERMANN einen ähnlichen Ansatz gegeben. Dabei sollte mit einem statistischen Modell, ausgehend von bestimmten haematogenen Organmetastasen auf den wahrscheinlichsten Primärtumor geschlossen werden. Aus einer Obduktionsstatistik wurden Häufigkeit und Sequenz wichtiger Metastasenlokalisationen für verschiedene Primärtumoren ermittelt. Mit den Daten der amtlichen Mortalitätsstatistik wurden dann alters- und geschlechtsabhängige Wahrscheinlichkeitsreihen für den Primärsitz von Tumoren bestimmt. Histologische Merkmale gingen in dieses Modell, das natürlich nur eine grobe Orientierungshilfe sein konnte, nicht ein.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, ob eine Verknüpfung von immunhistologischen mit klinisch-epidemiologischer Daten in einem statistischen Verfahren zu einer weiteren Erhöhung der Diagnosesicherheit führen könnte, um schließlich eine entscheidende Verbesserung der weiteren Diagnostik und Therapie zu erreichen. Insbesondere sollen damit kosten- und zeitintensive Untersuchungen mit allen subjektiven Risiken und Beeinträchtigungen für den Patienten möglichst vermieden bzw. ausschließlich gezielt zum Einsatz kommen können.

5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.2.1 Immunhistochemische Ergebnisse

5.2.1.1 Repräsentativität des Materials

Wegen des relativ seltenen Vorkommens von Metastasen mit unbekanntem Primärtumor im Routineuntersuchungsmaterial eines immunhistologischen Labors, wobei der Primärtumor häufig trotz Obduktion verborgen bleibt, sind hier ausschließlich die Tumormarkerspektren von Metastasen *bekannter* häufig vorkommender Adenokarzinome verwendet worden. Das setzt die Annahme voraus, dass Metastasen unbekannter Primärtumoren vergleichbare immunhistochemische Eigenschaften besitzen. Über den Wert der Immunhistochemie bei der Differenzierung von Metastasen im Rahmen eines CUP-Syndroms besteht heute kein Zweifel mehr [KRÜGER et al.1992]. GAMBLE et al (1993) kam bei der Verwendung eines Panels von 6 verschiedenen monoklonalen Antikörpern zur Identifizierung des Primärtumors ausgehend von Metastasenmaterial unter anderem zu dem Ergebnis, dass zwischen der Immunreaktivität von Metastasen und deren Primärtumoren keine signifikanten Unterschiede bestanden. Die Frage nach der Übereinstimmung immunhistochemischer Eigenschaften von Primärtumor und dessen metastatischen Absiedlungen ist hier nicht näher untersucht worden. Es wurde vorausgesetzt, dass der Rückschluß auf den Primärtumor ausgehend von den immunhistochemischen Ergebnissen des metastatischen Materials allgemein üblich und anerkannt ist.

Es wurden die Tumormarkerspektren von Metastasen häufiger Adenokarzinome wie der Mamma, des Ovars, der Niere, des Pankreas, des Magens, des Kolons und der Lunge untersucht. Die ebenfalls bedeutsamen Adenokarzinome der Prostata und der Schilddrüse wurden nicht berücksichtigt, da diese aufgrund der hochspezifischen Marker PSA bzw. Thyreoglobulin nur äußerst selten ein differentialdiagnostisches Problem darstellen. Karzinome des Corpus uteri gingen ebenfalls nicht in die Untersuchung ein, weil diese nur sehr selten im Rahmen eines CUP-Syndroms vorkommen, ebenso Leber- oder Hodentumoren.

5.2.2 Differenzierungsmöglichkeiten der untersuchten Metastasen

Die untersuchten Metastasen können im wesentlichen in drei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen beruhte die Diagnose bei Mamma- und Lungenkarzinommetastasen vor allem auf der Verwendung eines jeweils organspezifischen Markers, und zwar gegen GCDFP-15 und das Surfactant A-Protein. Der positive Nachweis von GCDFP-15 erbrachte bereits eine 91%ige Zuordnungswahrscheinlichkeit zum primären Mammakarzinom, der Nachweis von Surfactant A brachte für das Lungenkarzinom sogar eine Zuordnungswahrscheinlichkeit von 98%. Nachteilig wirkte sich die relativ geringe Sensitivität der genannten Marker aus. Fiel das Färbeergebnis für die beiden hochspezifischen Marker negativ aus, so war eine sichere Zuordnung zum Primärtumor meist nicht möglich. In wenigen Fällen konnte auf der Grundlage von Kombinationen der übrigen wenig spezifischen Marker auf den Primärtumor geschlossen werden. Eine Abhängigkeit der Expression der spezifischen Marker GCDFP-15 und Surfactant A vom Differenzierungsgrad wurde deutlich. Das heißt mit zunehmender Entdifferenzierung wird der positive Nachweis von GCDFP-15 bzw. Surfactant A seltener.

Das vorgestellte statistische Verfahren gewinnt vor allem an Bedeutung bei der Bewertung der zahlreichen Kombinationsvarianten wenig spezifischer Marker, wie in der 2. Gruppe der Kolon-, Nieren- und Ovarialkarzinommetastasen. Trotz fehlender organspezifischer Marker sind hier auf der Grundlage bestimmter Kombinationen von Färbeergebnissen hohe Zuordnungswahrscheinlichkeiten zu erreichen. Die weniger spezifischen Marker wie Vimentin, CEA, CK20 und CK7 werden hier mit insgesamt größerer Regelmäßigkeit nachgewiesen als beispielsweise GCDFP-15 und Surfactant A bei Mamma- bzw. Lungenkarzinommetastasen, so dass sie in der Kombination sehr stark an Aussagekraft gewinnen. Die Differenzierung von Nieren- und Kolonkarzinommetastasen kann daher in den meisten Fällen mit hoher Sicherheit erfolgen. Von den Ovarialkarzinommetastasen kann dagegen nur etwa ein Drittel relativ sicher bestimmt werden.

Bei den verbliebenen Pankreas- und Magenkarzinommetastasen ließ sich bei fehlendem organspezifischem Marker innerhalb des gewählten Panels auch keine typische Markerkonstellation darstellen, so dass eine sichere Differenzierung nicht gelang. Auch in den Arbeiten von GAMBLE et al. (1993) und BROWN et al. (1996) über immunhistochemische Differenzierungsmöglichkeiten metastatischer Adenokarzinome wurde lediglich eine Zuordnung zum Gastrointestinaltrakt bzw. zum oberen Gastrointestinaltrakt vorgenommen. Eine weitere Differenzierung gelang nicht.

Läßt sich die Zahl der möglichen Primärlokalisationen bereits im Vorfeld auf Grund von klinischen oder histomorphologischen Aspekten eingrenzen, so kann in den allermeisten Fällen mit hoher Diagnosesicherheit zwischen Lungen- und Mammakarzinom bzw. zwischen Lungen- und Kolonkarzinom oder Ovarial- und Kolonkarzinom unterschieden werden. Diese differentialdiagnostischen Überlegungen könnten praktisch relevant werden, wenn es generell zu entscheiden gilt, ob es sich

gegebenenfalls um eine Metastase eines aktuellen oder früheren bekannten Tumorleidens oder um einen primären Zweittumor handelt.

Im folgenden sollen die immunhistochemischen Ergebnisse für die verwendeten Marker im Literaturvergleich diskutiert werden:

5.2.2.1.1 GCDFP-15

Im Vergleich mit Ergebnissen in der Literatur zeigte sich für das GCDFP-15 im vorliegenden Datenmaterial eine mit 61% etwas geringere Sensitivität als beispielsweise bei MONTEAGUDO et al. (1990), die 71% GCDFP-15-positive schlecht differenzierte Mammakarzinommetastasen im Ovar beschrieben. Dagegen waren Metastasen ausgehend von Kolon-, Magentumoren oder Melanom, primäre Ovarialkarzinome sowie Ovarialmetastasen in der Mamma stets GCDFP-15-negativ. MAZOUJIAN et al. (1983) beschrieben erstmals GCDFP-15 als besonders nützlichen Marker zur Differenzierung von Mammakarzinommetastasen beim CUP-Syndrom, wobei mono- und polyklonale Antikörper verwendet wurden. Es fand sich in 75% der Fälle eine Immunreaktivität bei primären Mammakarzinomen mit apokrinen Merkmalen, bei 23% ohne apokrine Differenzierung. WICK et al. (1989) fand nach Ficin-Vorbehandlung ein positives Färbeergebnis für GCDFP-15 bei 72% primärer Mammakarzinome. In einzelnen Fällen wurden auch positive Ergebnisse für Prostata-, Blasen-, Nieren- und Ovarialkarzinome beschrieben. In unserem Datenmaterial gab es nur eine GCDFP-15-positive Metastase, die nicht von einem Mammakarzinom ausging sondern von einem Lungenkarzinom, so dass von einer hohen Spezifität (96%) dieses Markers ausgegangen werden konnte. Dazu im Gegensatz berichteten PERRY et al. (1997) über einen relativ hohen Anteil GCDFP-15-positiver Metastasen aus der Lunge (4%) und der Niere (14%) bei nur geringer Sensitivität von 33% für Mammakarzinommetastasen.

Innerhalb unserer gewählten Markerkombination ist das GCDFP-15 von entscheidender Bedeutung für die Differenzierung von Mammakarzinommetastasen, insbesondere zur Abgrenzung von Ovarialkarzinommetastasen. Ein positiver Nachweis gewinnt noch an Aussagekraft in Verbindung mit einem positiven CK7- und Estrogenrezeptornachweis bzw. einem negativem CEA. Prinzipiell kann jedoch bei positivem Nachweis des hochspezifischen GCDFP-15 unabhängig von den übrigen Färbeergebnissen mit relativ hoher Sicherheit von einem primären Mammakarzinom ausgegangen werden. Interessant wird also die Anwendung des vorgestellten statistischen Verfahrens für die GCDFP-15-negativen Metastasen. Innerhalb dieser Metastasengruppe, die überwiegend schlechter differenziert war, konnte allerdings nur in drei Fällen eine korrekte Zuordnung mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit erfolgen.

5.2.2.1.2 Vimentin

Bedeutsam war hier der regelmäßige Nachweis von Vimentin bei sämtlichen Nierenkarzinommetastasen, der in Kombination mit einem negativen Färbeergebnis für CK7 mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein primäres Nierenkarzinom sprach. Eine ebenfalls 100%ige Vimentinexpression wird in der der Literatur lediglich von AZUMI

und BATTIFORA (1987) gefunden, allerdings nur bei alkoholfixierten Präparaten. Die übrigen Angaben differieren stark. MOLL et al. beschrieben 1986 einen Anteil von 82%, HERMAN et al. 1983 sprachen von 92%. Dagegen fanden DONHUIJSEN und SCHULZ 1989 nur 30% Vimentin-positive Formalin-fixierte Nierenzellkarzinome. Die außergewöhnlich gute Differenzierbarkeit von Nierenkarzinommetastasen in unserem Datenmaterial ist daher wohl nicht generell gegeben.

In der Literatur wird von DOMAGALA et al. (1989) eine Vimentinexpression von Mammakarzinomen in 23% beschrieben, vor allem in den schlechter differenzierten Tumoren (G 3), kein Fall dagegen unter G1-Tumoren, und in Verbindung mit einer geringen ER-Expression. In ähnlicher Weise wurden im vorliegenden Datenmaterial 10 (9%) Vimentin-positive Mammakarzinommetastasen beobachtet, darunter 6 G3- und 4 G2-Tumoren, jedoch kein G1-Tumor. In keinem Fall lag gleichzeitig ein positiver Estrogenrezeptor vor, in 2 Fällen ein positiver GCDFP-15-Nachweis. Diese Tatsache machte sich insbesondere bei der Differenzierung von Ovarialkarzinommetastasen bemerkbar, die häufig sowohl Estrogenrezeptor als auch Vimentin exprimierten.

5.2.2.1.3 CEA

Der am längsten bekannte Tumormarker stellte sich im vorliegenden Material wie erwartet als wenig spezifischer, aber hochsensitiver Marker für Tumoren gastrointestinalen Ursprungs dar. SHEAHAN et al. haben 1990 monoklonale Antikörper gegen 4 verschiedene Epitope untersucht. Zum Teil wurden auch polyklonale Antikörper verwendet. Dabei wurde eine konstante Positivität für alle gastrointestinalen Tumoren beschrieben (Oesophagus-, Magen-, Dünndarm-, Pankreas-, kolorektale Tumoren, Tumoren der Gallenwege). Inkonstant negativ waren die Ergebnisse für Tumoren des Endometriums und nicht-muzinöse Ovarialkarzinome. Zum Teil positiv für CEA erwiesen sich jeweils etwa 50% der Lungen- und der muzinösen Ovarialkarzinome. Wie auch in unserem Material waren Nierenkarzinome bzw. deren metastatische Absiedlungen konstant CEA-negativ. Mammakarzinommetastasen zeigten sich mit 19% seltener CEA-positiv als bei unseren Ergebnissen (29%). Konstant positiv reagierten bei uns nur die Kolonkarzinommetastasen. Der Anteil CEA-positiver Magen- und Pankreaskarzinommetastasen war jedoch mit 80 bis 90% ebenfalls recht hoch. Bedeutsam ist auch die von SHEAHAN berichtete weitgehende Übereinstimmung der Markerprofile der Primärtumoren und ihrer Metastasen. Damit wird die Vorgehensweise, vom Markerspektrum einer Metastase im Rahmen eines CUP-Syndroms auf den möglichen Primärtumor zu schließen, zusätzlich gestützt.

Innerhalb der hier verwendeten Markerkombination wird der Nachweis von CEA bedeutsam insbesondere in Verbindung mit CK20 und CK7 für gastrointestinale Tumoren einerseits, sowie in Verbindung mit einem positiven Estrogenrezeptor für GCDFP-negative Mammakarzinommetastasen zur Abgrenzung gegen Ovarialkarzinommetastasen andererseits.

5.2.2.1.4 CK20

Der Nachweis von CK20 gilt ebenfalls vor allem als Hinweis auf einen gastrointestinalen Tumor. MOLL et al. fanden 1992 eine CK20-Positivität in 89 von 93 Kolonkarzinomen, in 18 von 45 Pankreas- und in 16 von 32 Magenkarzinomen. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit unseren überein. Die untersuchten Kolonkarzinommetastasen waren ebenfalls ganz überwiegend CK20-positiv (88%), Pankreas- und Magenkarzinommetastasen dagegen nur in etwa der Hälfte der Fälle. Ein überwiegend negatives Färbeergebnis mit einzelnen Ausnahmen ergab sich bei MOLL et al. wie auch in der vorliegenden Arbeit für Lungen- und Mammakarzinome, letztere waren bei uns komplett CK20-negativ. Nierenkarzinome zeigten sich bei Moll et al ausschließlich CK20-negativ. In unserem Material waren Nierenkarzinommetastasen bis auf 2 Ausnahmen ebenfalls negativ. Perry et al berichteten 1997 über 93% CK20-positive Kolonkarzinome gegenüber komplett negativer Ergebnisse für Mamma- und Lungenkarzinome. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird die Bedeutung des CK20 zur Abgrenzung gastrointestinaler Tumoren deutlich, insbesondere der Kolonkarzinome.

5.2.2.1.5 CK7

Innerhalb unseres gewählten Panels kommt dem positiven CK7-Nachweis differentialdiagnostisch nur eine geringe Bedeutung zu. Ein negatives Färbeergebnis wird allerdings ausschlaggebend in Verbindung mit einem positiven Vimentinnachweis zur Abgrenzung von Nierenkarzinommetastasen und mit einem positiven CEA- bzw. CK20-Nachweis zur Abgrenzung von Kolonkarzinommetastasen. In unserem Datenmaterial waren lediglich 3 Nierenkarzinommetastasen (7%) sowie 5 Kolonkarzinommetastasen (12%) CK7-positiv. PERRY et al. (1997) fanden dagegen einen positiven CK7-Nachweis bei 7% der Kolonkarzinome und 29% der Nierenkarzinome.

Im Vergleich zu den Kolonkarzinommetastasen war der Anteil unserer CK7-positiven Ergebnisse bei Magen- als auch bei den Pankreaskarzinommetastasen mit 36% und 31% deutlich höher, so dass hier eine Abgrenzung der Kolonkarzinommetastasen von den übrigen gastrointestinalen Tumoren möglich wurde.

Ganz überwiegend positiv waren die Färbeergebnisse hier bei Mamma-(93%), Ovarial-(97%) und Lungenkarzinommetastasen (89%). Demgegenüber beschrieben PERRY et al. (1997) zu 100% CK7-positive Lungenkarzinome und 93% Mammakarzinome.

LOY and CALALUCE (1994) untersuchten die Möglichkeit der Differenzierung von insgesamt 151 Lungenadenokarzinomen und Kolonkarzinomen mit Hilfe von CK7 und CK20. Dabei wiesen 77% der Kolonkarzinome die Kombination CK20+/CK7- auf, jedoch kein Lungentumor. Die Kombination CK20-/CK7+ fand sich dagegen bei 86% der Lungenkarzinome, in keinem Fall bei Kolonkarzinomen.

5.2.2.1.6 Estrogenrezeptor

Ein immunhistochemischer Nachweis von Estrogenrezeptorprotein wies in unseren Ergebnissen mit geringer Sensitivität, aber hoher Spezifität auf einen Primärtumor der Mamma oder des Ovars hin. Lediglich in einem Fall wurde ein positiver Estrogenrezeptornachweis an einer Metastase anderen Ursprungs geführt. Es handelte sich dabei um eine maligne Absiedlung eines Lungenadenokarzinoms. Im Gegensatz dazu fanden KOJIMA et al. 1991 Estrogen-positive Magenkarzinome in etwa 20% der untersuchten Fälle, vorwiegend bei jungen Patientinnen und undifferenzierten Karzinomen, aber auch vereinzelt bei männlichen Patienten. PERRY et al. beschrieben 1997 außerdem eine Estrogenpositivität zwischen 11 und 14 % von Lungen-, Kolon- und Nierenkarzinomen. Der Anteil Estrogen-positiver Mammakarzinome (33%) entsprach dabei etwa unseren Ergebnissen (37%). Abgesehen von möglichen therapeutischen Konsequenzen, die sich aus dem positiven Estrogenrezeptorstatus ergeben könnten, ist die differentialdiagnostische Bedeutung für das Mammakarzinom aufgrund der mangelnden Sensitivität als eher gering anzusehen. Ovarialkarzinommetastasen wiesen mit 54% einen höheren Anteil positiver Färbeergebnisse auf. In Verbindung mit einem positiven Vimentinnachweis bestand hier die Möglichkeit zur Abgrenzung von Ovarialkarzinommetastasen, da ein gleichzeitiger positiver Nachweis von Estrogenrezeptor und Vimentin bei Mammakarzinommetastasen nicht vorkam.

5.2.2.1.7 Surfactant A

NICHOLSON et al. publizierten 1995 eine Arbeit über den immunhistochemischen Nachweis des Surfactant A-Proteins bei 107 primären Lungenkarzinomen, 40 anderen Adenokarzinomen und 26 pulmonalen bzw. pleuralen Adenokarzinommetastasen. Während Plattenepithelkarzinome sowie muzinöse Karzinome regelmäßig Surfactant A-negativ waren, zeigten 60% der Lungenadenokarzinome eine positive Reaktion. Stets negativ erwiesen sich auch die Färbeergebnisse bei pulmonalen Metastasen von Primärtumoren außerhalb der Lunge. Daraus ergibt sich eine hohe Spezifität bei allerdings nur mittelgradiger Sensitivität für Lungenadenokarzinome. Der Anteil Surfactant A-positiver Metastasen war im vorliegenden Datenmaterial mit 40% noch geringer. Die hohe Spezifität konnte bestätigt werden. Keine Metastase eines nicht-pulmonalen Tumors bot ein positives Färbeergebnis für Surfactant A. Mit dem positiven Nachweis kann eine nahezu zweifelsfreie Zuordnung zum Adenokarzinom der Lunge erfolgen, unabhängig vom übrigen Markerspektrum. Die Anwendung des vorgestellten statistischen Verfahrens käme somit nur für die Differenzierung Surfactant-negativer Metastasen in Betracht. Auf diese Weise konnte in weiteren 5 Fällen (11%) mit hoher Wahrscheinlichkeit eine richtige Differenzierung erfolgen. Maßgeblich war dabei die Konstellation: Vimentin „positiv“/ CEA „positiv“/ CK20 „negativ“.

5.3 DISKUSSION DER METHODIK

5.3.1 Möglichkeiten und Grenzen des vorgestellten statistischen Verfahrens

Bereits bei der Bewertung des jeweiligen Färbeergebnisses ergibt sich das Problem, dass bei Anwendung des statistischen Verfahrens keine Abstufungen der positiven oder negativen Färbeergebnisse berücksichtigt werden können. Die zwangsläufig relativ willkürliche Grenze zwischen negativem und positivem Ergebnis verläuft hier bei etwa 10 % positiver Färbung eines histologischen Präparates. Die Unterscheidung zwischen „schwach positiv“ und „stark positiv“, bzw. zwischen komplett „negativ“ und einzelnen angefärbten Zellen, die in jede subjektive Beurteilung eingehen würde, kann statistisch wegen der dafür notwendigen sehr hohen Fallzahlen nicht verwertet werden. Eine differenziertere Betrachtung der Färbeergebnisse wird jedoch im Einzelfall bei der kritischen Auseinandersetzung mit der ermittelten Zuordnungswahrscheinlichkeit hilfreich sein.

Ein weiteres Problem stellt die unterschiedliche Fallzahl dar, mit der die einzelnen Primärtumoren im Untersuchungsmaterial vertreten sind. Um den daraus resultierenden Einfluß auf die Zuordnungswahrscheinlichkeit auszugleichen, ist eine Wichtung der Fälle umgekehrt proportional zur relativen Häufigkeit vorgenommen worden. Damit wurde eine annähernde Gleichverteilung der Fälle hergestellt, die natürlich nicht der Realität entspricht. Die tatsächliche Häufigkeitsverteilung der Primärtumoren bei CUP-Fällen kann auf der Grundlage der bisherigen Studien nur unzureichend eingeschätzt werden und konnte daher hier keine Verwendung finden. Mit der angenommenen annähernden Gleichverteilung wird in Kauf genommen, dass die Ergebnisse der weniger häufigen Primärtumoren möglicherweise überbewertet werden. An dieser Stelle sei nochmals betont, dass es sich bei den angegebenen Zuordnungswahrscheinlichkeiten lediglich um Richtwerte handelt. Wird also die Wahrscheinlichkeitsreihe von einem Primärorgan angeführt und das nächste Organ folgt mit einem Abstand von wenigen Prozentpunkten, so ist in diesem Fall eine Entscheidung statistisch nicht möglich.

Im allgemeinen ist hier von einer ausreichend hohen Diagnosesicherheit ausgegangen worden, wenn eine Zuordnungswahrscheinlichkeit zum jeweiligen Primärorgan von über 90% erreicht wurde. In diesem Bereich kamen im gesamten Material ohne Einschränkung der Organauswahl 9 Fehlinterpretationen vor. Unter dieser Maßgabe erreicht die vorgestellte Methode eine Spezifität von 95% bei allerdings nur geringer Sensitivität von 46%. In Ausnahmefällen kann es jedoch vorkommen, dass 2 verschiedene Primärorgane mit jeweils über 90%iger Wahrscheinlichkeit als Metastasenursprung vorgeschlagen werden, da innerhalb eines Markerspektrums unabhängig voneinander mehrere organotypische Konstellationen enthalten sein können. Ein Beispiel wäre die Mammakarzinommetastase mit dem Markerspektrum GCDFP-15 +/- ER-/ Vimentin+/ CK 20-/ CK7-/CEA-/Surfactant-. Der positive Nachweis von GCDFP-15 begründet eine Zuordnungswahrscheinlichkeit von 91% für das primäre Mammakarzinom. Gleichzeitig spricht der positive Vimentinnachweis bei negativem

CK7 für ein Nierenkarzinom mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. In diesem Falle muß die Frage entschieden werden, ob es sich eher um ein falsch-negatives Ergebnis für CK7 oder ein falsch-positives für GCDFP-15 handelt. Hier geht es auch generell um die Frage, ob ein positives Färbeergebnis mehr Gewicht hat als ein negatives. Da die Angaben über die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse von Marker zu Marker sehr unterschiedlich sind und darüberhinaus auch von Labor zu Labor variieren, wurden sie nicht mit zur Diskriminierung herangezogen. Prinzipiell besteht hier jedoch eine entscheidende Verbesserungsmöglichkeit für das Verfahren. Allein die höhere Bewertung von positiven im Vergleich zu negativen Ergebnissen kann zu einer Verbesserung der Resultate führen.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass in dem vorgestellten Verfahren die jeweiligen Färbeergebnisse für jedes Primärorgan unabhängig voneinander in die Berechnungen eingehen. Das heißt, dass Gruppenzuordnungen, wie beispielsweise zu den Primärorganen Mamma *oder* Ovar bzw. Magen *oder* Pankreas, durch das Programm zur

Zeit noch nicht geleistet werden können. Hierzu ein Beispiel: Ein positiver Estrogenrezeptor läßt den Primärtumor zunächst einmal in Ovar oder Mamma vermuten. Die angegebene Zuordnungswahrscheinlichkeit wird also zu etwa gleichen Teilen zwischen beiden Organen aufgeteilt. So kann es passieren, dass innerhalb des Markerspektrums eine aussagefähige Konstellation für den wahrscheinlichsten Primärtumor ausschlaggebend wird, die den Estrogenrezeptor nicht berücksichtigt und somit die höchste Zuordnungswahrscheinlichkeit für ein anderes Primärorgan ermittelt. Dem kann begegnet werden, indem die Zahl der fraglichen Primärorgane möglichst schon initial über die Option der Organauswahl eingegrenzt wird. Im vorliegenden Material ist es bei positivem Estrogenrezeptornachweis nahezu ausgeschlossen, dass sich der Primärsitz des Tumors außerhalb von Mamma oder Ovar befindet.

Findet sich ein positives Färbeergebnis für die beiden hochspezifischen Marker GCDFP-15 oder Surfactant A erübrigt sich im Grunde die Anwendung des Verfahrens, da beide unabhängig von den übrigen Färbeergebnissen bereits mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit den Hinweis auf den entsprechenden Primärtumor liefern.

Der klare Vorteil und der eigentliche Zweck des Verfahrens liegt ganz offensichtlich in der Suche und Bewertung typischer Kombinationen von wenig spezifischen Tumormarkern. Es kann Bedeutung erlangen für solche Metastasen, für die keine organspezifischen Marker existieren bzw. die für ihren spezifischen aber wenig sensitiven Marker ein negatives Ergebnis aufweisen. Angesichts der Tatsache, dass es sich beim CUP-Syndrom vor allem um wenig differenzierte, histomorphologisch nicht klassifizierbare Metastasen handelt und gleichzeitig mit zunehmender Entdifferenzierung die Expression der hochspezifischen Marker seltener wird (wie hier für GCDFP-15 und Surfactant A festgestellt), wird die Bedeutung des vorgestellten Verfahrens ersichtlich. Sinnvoll wäre ein stufenweises Vorgehen, indem zunächst mit Hilfe der hochspezifischen Marker GCDFP-15, Surfactant A und Estrogenrezeptor bei positivem Färbeergebnis bereits eine klare Zuordnung erfolgen kann - zum primären Mammakarzinom, zum primären Lungenadenokarzinom bzw. zu Mamma- oder Ovarialkarzinom. Bei negativem Ergebnis wären dann auch die übrigen Marker zu

verwenden. In diesem Falle kann das vorgestellte statistische Verfahren zur Diagnosefindung hilfreich sein.

Das vorgestellte Verfahren bietet in kürzester Zeit eine Orientierung über die wahrscheinlichsten Primärlokalisationen von metastatischen nichtmuzinösen Adenokarzinomen, kann aber auch für andere Fragestellungen im Rahmen von CUP-Syndromen mit entsprechend variablen Tumormarkerkombinationen zur Anwendung kommen. Für den Patienten hätte die Kenntnis der wahrscheinlichsten Organlokalisation des Primärtumors zur Folge, dass die eventuell nachfolgende Diagnostik zielgerichteter und damit effektiver gestaltet werden könnte, einhergehend mit einer Ersparnis an Zeit, Kosten und nicht zuletzt subjektiven Beeinträchtigungen.

Das Verfahren sollte in Auswertung der genannten Ergebnisse weiter verbessert werden. Neben einer hierarchischen Abarbeitung von hochspezifischen Markern und weniger spezifischen Markern ist es sinnvoll, bestimmten Markern auch Gruppen von Tumoren zuzuordnen und dies im Klassifikationsschema entsprechend umzusetzen. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit besteht darin, die laborspezifische Wahrscheinlichkeit von falsch/positiven und falsch/negativen Ergebnissen mit einzubeziehen. Dies kann für Färbeautomaten mit guter Reproduzierbarkeit bestimmt werden. In die Güteberechnungen würden diese Wahrscheinlichkeiten dann als Faktoren eingehen.

Die postulierte Unabhängigkeit der einzelnen Marker voneinander ist ein weiteres Problem. Über Vortests können bestimmte Abhängigkeiten herausgefunden werden und von den abhängigen Merkmalen jeweils nur eins einbezogen werden.

Prinzipiell ist auch an ein ganz anderes statistisches Verfahren zur Zuordnung zu denken, etwa an Neuronale Netze. Es würde ein sinnvolles Experiment darstellen, die gefundenen Ergebnisse mit den mit Neuronalen Netzen erzielbaren Klassifikationsgüten zu vergleichen.

5.3.2 Zur Möglichkeit der statistischen Verwendung klinisch-epidemiologischer Daten zum Metastasierungsverhalten und zur Inzidenz von Adenokarzinomen

Nach Durchsicht der Literatur zum Thema CUP-Syndrom erwies sich die Einbeziehung klinisch-epidemiologischer Daten in das vorgestellte statistische Verfahren zur Erhöhung der Diagnosewahrscheinlichkeit als nicht praktikabel. Das bisher zur Verfügung stehende Datenmaterial entstammt überwiegend älteren Arbeiten aus den 70er und 80er Jahren mit meist nur geringen Fallzahlen. Die umfangreichsten Autopsiestudien wurden 1977 von DIDOLKAR et al. mit 254 Patienten und NYSTROM et al. mit 264 Patienten vorgelegt, wobei zu einem erheblichen Teil die Lokalisation des Primärtumors bis zuletzt ungeklärt blieb. Von LE CHEVALIER (1988) wurden 255 CUP-Fälle mit autopsisch oder im Verlauf klinisch gesichertem Primärtumor untersucht. In den letzten zwei Jahrzehnten ist das CUP-Syndrom in der Literatur zunehmend differenzierter betrachtet worden, wobei das Hauptaugenmerk auf therapierbare Subgruppen gelenkt wurde.

Es fehlen also verwertbare Statistiken bezüglich der Inzidenz und des Metastasierungsverhaltens speziell der Adenokarzinome im Rahmen eines CUP-Syndroms. Andererseits erscheint die Übertragung der Inzidenzen bekannter Adenokarzinome auf das CUP-Syndrom nicht zulässig, da bei letzterem regelmäßig das Pankreas oder die Lunge als häufigstes Primärorgan in Erscheinung trat. Die üblichen Krebsstatistiken werden dagegen vom Mamma-, Corpus- und Kolonkarzinom bei Frauen und vom Bronchial-, Magen- und Prostatakarzinom bei Männern angeführt. Schließlich beschrieben NYSTROM et al. ein zum Teil deutlich abweichendes Metastasierungsverhalten beim CUP-Syndrom im Vergleich zu den übrigen Primärtumoren. Bestätigt wurde diese Beobachtung von LE CHEVALIER et al. (1988), die ebenfalls Metastasenlokalisationen vorfanden, die sich regelmäßig von denen der allgemeinen Statistiken unterschieden.

Eine schlüssige Erklärung für dieses Phänomen fehlt bis heute. Denkbar wäre, dass möglicherweise diejenigen Faktoren, die das weitere Wachstum des Primärtumors beim CUP-Syndrom hemmen, auch an den ersten („typischen“) Metastasenlokalisationen zur Wirkung kommen. Erst im weiteren Verlauf der Metastasierung im Zuge der Selektion von immer aggressiver wachsenden Zelllinien werden die Metastasierungsmuster diffuser, unspezifischer und schließlich klinisch-radiologisch faßbar. Unter dieser Vorstellung wäre auch die insgesamt schlechte Prognose des CUP-Syndroms erklärlich, da es sich in diesem Falle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung immer um ein weit fortgeschrittenes Krankheitsbild handeln würde.

In jedem Falle wird aber die Übertragung typischer Metastasierungsmuster gewöhnlicher primärer Adenokarzinome auf das CUP-Syndrom sehr zweifelhaft. Für das vorgestellte statistische Verfahren mußten wir uns daher auf die Nutzung der Ergebnisse der Immunhistochemie beschränken. Selbstverständlich werden darüber hinaus die Kenntnis des Lebensalters, des Geschlechts, der Risikofaktoren (z.B. Rauchen), der Metastasenlokalisation, der Mikroskopie usw. mit entsprechender Gewichtung in die diagnostischen Überlegungen des Untersuchers einfließen müssen. Aufgrund der Datenlage erscheint jedoch eine direkte statistische Auswertung dieser Informationen zur Zeit nicht sinnvoll. Hierfür wären gesonderte statistische Erhebungen über das Metastasierungsverhalten im Rahmen eines CUP-Syndroms eine notwendige Voraussetzung. Diese liegen zwar teilweise vor, zeigen jedoch sehr unterschiedliche und damit widersprüchliche Ergebnisse.

6 Zusammenfassung

Das Auftreten von Metastasen bei unbekanntem Primärtumor stellt nach wie vor ein in vieler Hinsicht offenes Problem dar. Es betrifft zwischen 2 bis max. 10% aller Krebspatienten. Häufig werden diese einer aufwendigen und zum Teil belastenden Diagnostik unterzogen, um den Primärtumor zu finden und eine entsprechende Therapie folgen zu lassen. In der überwiegenden Zahl der Fälle handelt es sich hierbei um ein metastasierendes Adenokarzinom. Meist muß man dabei von einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit eher schlechter Prognose ausgehen. Umso wichtiger erscheint daher die rasche Differenzierung potenziell kurabler oder zumindest palliativ therapierbarer Karzinome.

Aus der hier getroffenen Auswahl häufig auftretender Adenokarzinome sind u.a. das Mamma- und das Ovarialkarzinom prinzipiell einer Chemotherapie zugänglich. Um nach Entdeckung des metastatischen Herdes die nachfolgende Diagnostik effektiver zu gestalten, ist das hier vorgestellte statistische Verfahren entwickelt worden. Dabei können Wahrscheinlichkeitsangaben für die mögliche Organlokalisation des Primärtumors auf der Grundlage von immunhistologischen Färbeergebnissen mit 7 verschiedenen Tumormarkern (CEA, CK7, CK20, ER, GCDFP-15, Surfactant A, Vimentin) geliefert werden.

Das histologische Untersuchungsmaterial umfaßte 313 Adenokarzinommetastasen mit bekanntem Primärtumor in Mamma, Ovar, Lunge, Niere, Kolon, Magen und Pankreas.

Die ursprünglich geplante Integration von klinisch-epidemiologischen Daten in ein statistisches Modell zur Erhöhung der Diagnosesicherheit erwies sich als nicht praktikabel, da die bisher vorliegenden Daten über Inzidenz und Metastasierungsverhalten von CUP-Tumoren unzureichend sind. Eine Übertragung der üblichen Tumorstatistiken auf CUP-Tumoren, die sich im Hinblick auf Inzidenz und Metastasierung grundlegend anders verhalten, erscheint dagegen nicht sinnvoll.

Auf der Grundlage der immunhistologischen Ergebnisse lassen sich mit Hilfe des statistischen Verfahrens 46% der Metastasen ihrem Primärtumor zuordnen, unter der Annahme einer ausreichenden Diagnosesicherheit bei einer Zuordnungswahrscheinlichkeit von $\geq 90\%$. Die Methode erreicht damit eine Spezifität von 95%. Mamma- und Lungenadenokarzinommetastasen wurden vor allem aufgrund des positiven Färbeergebnisses für ihren hochspezifischen Marker GCDFP-15 bzw. Surfactant A differenziert, wobei eine Abhängigkeit der Expression vom Differenzierungsgrad festgestellt wurde. Mit zunehmender Entdifferenzierung wurden die Färbeergebnisse für diese hochspezifischen Marker seltener positiv, gleichzeitig nahm damit die Zuordnungswahrscheinlichkeit zum Ausgangstumor ab.

Da die Diagnose bei positivem Nachweis von GCDFP-15 und Surfactant A unabhängig von den übrigen Ergebnissen gestellt werden konnte, wird die Anwendung des Verfahrens erst bedeutsam für Metastasen, die für ihren organspezifischen Marker

negativ sind, bzw. für Kolon-, Nieren- und Ovarialkarzinommetastasen, die zum Teil charakteristische Markerspektren aufweisen und damit recht gut zu differenzieren waren. Eine Differenzierung von Magen- und Pankreaskarzinommetastasen war dagegen aufgrund der sehr ähnlichen Markerprofile nicht möglich.

Vorgeschlagen wird ein stufenweises Vorgehen, wobei mit Hilfe der spezifischen Marker GCDFP-15, Surfactant A und Estrogenrezeptor zunächst eine Zuordnung zu den Primärtumoren der Mamma, der Lunge bzw. der Mamma oder des Ovars erfolgen kann. Bei negativem Ergebnis sollten die übrigen Tumormarker untersucht und im Anschluß das vorgestellte Verfahren Verwendung finden. Mit den auf diese Weise erzielten Zuordnungswahrscheinlichkeiten, kann bei geringem Zeitaufwand eine Orientierungshilfe gegeben werden, um schließlich unter Berücksichtigung der Gesamtsituation eine Diagnose stellen zu können bzw. eine zielgerichtete weitere klinisch-radiologische Diagnostik folgen zu lassen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTMAN E, CADMAN E: An analyses of 1539 patients with cancer of unknown primary site. *Cancer* **57**:120-124, 1986
2. ALTMANNBERGER M, DROESE M, OSBORN M, WEBER K: Immunhistologische Klassifizierung von Metastasen bei unbekanntem Primärtumor. *Pathologe* **5**:269-274, 1984
3. ABRAMS HL, SPIRO R, GOLDSTEIN N.: Metastases in carcinoma. Analysis of 1000 Autopsied cases. *Cancer* **III**, 74 (1950)
4. AZUMI N, BATTIFORA H.: The distribution of Vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* **88**:286-296, 1987
5. BARZ H. AND BARZ D.: Zur Verteilung der Metastasen der Lungengeschwülste.II. Einfluß der Tumorphistologie. *Arch. Geschwulstforsch.* **52**, 561 (1982)
6. BASSERMANN R., LUDWIG G, HÖLZEL D UND EDER M: Haematogene Organmetastasen - welcher Primärtumor? *Pathologe* **5**: 13-20,1984
7. BATSON OV: The function of the vertebral veins and their role in the spread of metastasis. *Ann. Surg.* **112**, 138 (1940)
8. BATSON OV: Role of vertebral veins in metastatic processes. *Ann. Intern. Med.* **16**:38 (1942)
9. BOENISCH T: Färbemethoden. In Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden. Naish, S.J.(ed), DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA 1983; Bd.II, S.22-27
10. BROWN RW, CAMPAGNA LB, DUNN J.K., CAGLE PT: Immunohistochemical identification of tumor markers in metastatic adenocarcinoma, a diagnostic adjunct in the determination of primary site. *Am J Clin Pathol* 1997;**107**:12-19
11. CATTORETTI G, PILERI S, PARAVICINI C, BECKER MHG, POGGI S, BIFULCO C, KEY G, D'AMATO L, SABATTINI E, FEUDALE E, REYNOLDS F, GERDES J, RILKE F: *J Pathol*, **171**:83-98 (1993)
12. DE BRAUD F, HEILBRUN LK, AHMED K ET AL: Metastatic squamous cell carcinoma of an unknown primary localized to the neck: Advantages of an aggressive treatment. *Cancer* 1989; **64**:510-515
13. DIDOLKAR MS, FANOUS ET AL: Metastatic carcinomas from occult primary tumors, a study of 254 patients. *Ann Surg* 1977; **186**:625-630

14. DOMAGALLA W, LASOTA J, BARTKOWIAK J, WEBER K, OSBORN M: Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am J Pathol* 1990; **136**:219-227
15. DONHUIJSEN K, SCHULZ S: Prognostic significance of vimentin positivity in formalin-fixed renal cell carcinomas. *Path Res Pract* **184**:287-291, 1989
16. EDER M: Die Metastasierung: Fakten und Probleme aus humanpathologischer Sicht. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **68**, 1-11 (1984)
17. FIDLER IJ, KRIPKE ML: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor, *Science* **197** (1977) 893
18. FIDLER IJ, KRIPKE ML: Metastatic heterogeneity of cells from the K-1735 melanoma. in: *Metastatic Tumor Growth*, ed. E. Grundmann, Cancer Campaign Vol.4, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, NY (1980) 71
19. FIDLER IJ, GERSTEN DM, HART IR: The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.* **28** (1978) 149
20. GAMBLE AR, BELL JA, RONAN J, PEARSON D, ELLIS IO: Use of tumour marker immunoreactivity to identify primary site of metastatic cancer. *BMJ* 1993;**306**:295-298
21. GATTER KC, ALCOCK C, HERYET A, MASON DY: Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques. *The Lancet* 1985;**2**:1302-1305
22. GILBERT HA, KAGAN AR: Metastases: incidence, detection and evaluation without histologic confirmation, in Weiss, L. (ed): *Fundamental aspects of metastases*. New York, American Elsevier 1976, pp 385-405
23. GRECO FA, HAINSWORTH JD: Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: Recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; **104**:547-556
24. GRECO FA, HAINSWORTH JD: Cancer of unknown primary site. In *Cancer: Principles & Practice of Oncology* 1993. Ed. by Vincent T. DeVita, S. Hellman, St. A. Rosenberg (J.B. Lippincott Co., Philadelphia)
25. HAAGENSEN DE JR, MAZOUJIAN G, DILLEY WG, PEDERSON CE, KISTER SJ, WELLS SA JR: Breast gross cystic disease fluid analysis: I. Isolation and radioimmunoassay for a major component protein. *J Natl Cancer Inst* 1979, **62**: 239-247

26. HERMAN CJ, MOESKER O, KANT A, HUYSMANN A, VOOIJS GP, RAMAEKERS FCS: Is renal cell (Grawitz) tumor a carcinosarcoma? *Virchows Arch (Cell Pathol)* **44**:73-83, 1983
27. HEYDEN HW, HANSEN D, KABOTH U, NAGEL GA, HOFFMANN H, SCHNEIDER B: Metastasierendes Adenokarzinom bei unbekanntem Primärtumor. *Deutsch. med. Wschr.* **109**:15 -19,1984
28. HOLMES FF, FOUTS TL: Metastatic cancer of unknown primary site. *Cancer*, **26**:816-820, 1970
29. HOLZNER JH: *Allgemeine Pathologie der Geschwülste*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore,1989
30. HUFNAGL P, VOSS K: Fidelity estimation for a hierarchical classifier. *Biometr. J.* **27** (1985), 659-667
31. JASPERSEN D: Das CUP-Syndrom- Malignomerkrankung bei unbekanntem Primärtumor. *Fortschr Med* 110.Jg. (1992), **31**:587-588
32. JUNG W, OSTERWALDER B: Vorgehen bei Metastasen mit unbekanntem Primärtumor. *Schweiz. med. Wschr.* 1990; 120:Nr.**35**, 1273-1279
33. JORDAN WE, SHILDT RA: Adenocarcinoma of unknown primary site. *Cancer* **55**:857-860, 1985
34. KAUFMANN O, DEIDESHEIMER T, MUEHLENBERG M, DEICKE P, DIETEL M: Immunohistochemical differentiation of metastatic breast carcinomas from metastatic adenocarcinomas of other common primary sites. *Histopathol*, 1996, **29**:233-240
35. KLÖPPEL G: Diagnostische Schwerpunkte der Tumormarker: Gastrointestinale Tumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **70**, 159-171 (1986)
36. KOJIMA O, TAKAHASHI TT, KAWAKAMI S ET AL: Localization of Estrogen receptors in gastric cancer using immunohistochemical staining of monoklonal antibody. *Cancer*,1991,**67**:2401-2406
37. KRÜGER R, LEON DE F, MAIHOFF J: Der Wert der Immunhistochemie in der histologischen Routinediagnostik von Metastasen unbekannter Primärtumoren. *Pathologie* 1992, **13**:65-72
38. LE CHEVALIER T, CVITKOVIC E ET AL: Early metastatic cancer of unknown primary origin at presentation. *Arch intern med* 1988; **148**: 2035-2039
39. LOY TS, CALACUCE RD: Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 1994;**102**:764-767

40. MAZOUJIAN G, PINKUS GS, DAVIS S, HAAGENSEN DE JR: Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. *Am J Pathol* 1983, **110**: 105-112.
41. MAZOUJIAN G, PARISH TH, HAAGENSEN DE JR: Immunoperoxidase localization of GCDFP-15 with mouse monoclonal antibodies versus rabbit antiserum. *J Histochem Cytochem* 1988b, **36**: 377-382.
42. MENTER DG, CAVANAUGH PG, NICOLSON GL: Adhesion and growth properties of metastatic tumour cells that colonize specific organ sites. in: *Metastasis: Basic research and its clinical applications*. ed. H. Rabes, P.E. Peters, K. Munk, Karger, 1992 -Basel-Freiburg-Paris-London-New York-New Delhi-Bangkok-Singapore-Tokyo-Sydney
43. MIZOTANI Y, TAKASHI N, MORINAGA S ET AL: Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumours. Special reference to nonmucus producing lung adenocarcinomas. *Cancer* 1988;**61**, 532-537.
44. MOLL R, FRANKE W, SCHILLER D: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**:11-24 (1982)
45. MOLL R: Epitheliale Tumormarker. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **70**:28-50 (1986)
46. MOLL R, LÖWE A, LAUFER J, FRANKE WW: Cytokeratin 20 in Human Carcinomas, a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992, **140**:427-446
47. MONTEAGUDO C, MERINO MJ, LA PORTE N, NEUMANN RD: *Hum Pathol* **22**:368-372 (1990)
48. MUIR C: Cancer of unknown primary site. *Cancer* 1995;**75**: Suppl. 353-356
49. NEDERGAARD L, HAERSLEV T, JACOBSEN G.K: Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS* **103**:20-24, 1995
50. NICHOLSON AG, MCCORMICK CJ, SHIMOSATO Y, BUTCHER DN, SHEPPARD MN: The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and metastatic lung tumours. *Histopathol* 1995;**27**: 57-60
51. NOLTENIUS H: *Tumorhandbuch, Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren*. 2.Auflage. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1987

52. NYSTROM JS, WEINER JM, HEFFELFINGER-JUTTNER J ET AL:
Metastatic and histologic presentations in unknown primary cancer. *Sem in Oncol* **4**:53-58,1977
53. NYSTROM JS, WEINER JM, WOLF RM, BATEMAN JR, VIOLA MV:
Identifying the primary site in Metastatic cancer of unknown origin. *JAMA* **241**:381-383, 1979
54. OSBORN M, WEBER K: Tumour diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest*, **48**:372-381, 1983
55. OSTEN RT, KOPF G, WILSON RE: In Pursuit of the unknown primary. *Am J Surg* 1978;**135**:494-498
56. PARKIN DM, MUIR GS, WHELAN S ET AL (eds.): Cancer incidence in five continents, Vol VI (IARC scientific publications No. **120**) IARC, Lyon, 1993
57. PERRY A, PARISI JE, KURTIN PJ: Metastatic adenocarcinoma to the brain: An immunohistochemical approach. *Hum Pathol* 1997 Aug; **28**(8):938-43
58. RABES H, PETERS PE, MUNK K (eds): Basic research and ist clinical applikations. *Contrib. Oncol.* , Vol.44,Karger 1992 –Basel
59. RAMAEKERS F ET AL: Use of monoklonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenokarzinomas. *Am J Pathol*, 1990,**136**:641-655
60. RUDDON RW, NORTON SE: Use of biological markers in the diagnosis of cancers of unknown primary tumor. *Sem Oncol*, 1993 Jun. **20** (3): 251-260
61. SCHMITZ-MOORMANN P, GEBERT G, THOMAS C: Allgemeine Pathologie, ed. C. Thomas, Schattauer-Verl., Stuttgart, New York, 1995
62. SHEAHAN K, O'BRIEN MJ, BURKE B, DERVAN PA, O'KEANE JC, GOTTLIEB LS, ZAMCHECK N: Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol*, 1990;**94**:157-164
63. SHLIEN S: Nonparametric classification unsing matched binary decision trees. *Patt Rec Lett* (1992);**13**:83-87
64. SHIMOSATO Y, HIROHASHI S, NOGUCHI M, MATSUNO Y, TOME Y.
Recent advances in the pathological diagnosis of lung cancer. Application of monoclonal antibodies and cytofluorometry for subtyping. In: Lung cancer differentiation. Implications for diagnosis and treatment, Bernal SE, Hesketh PJ, ed. 1992: 279-282
65. SNEE MP, VYRAMUTHU N: Metastatic carcinoma from unknown primary site: the experience of a large oncology centre. *Br J Rad*, 1985, **58**:1091-1095

66. SOUHAMI R, TOBIAS J: Cancer and its management. 1995, 2. Auflage, Blackwell Science Ltd.
67. SPORN JR, GREENBERG BR: Empiric chemotherapy in patients with carcinoma of unknown primary site. *Am J Med* 1990;**88**:49-55
68. STEWART JF, TATTERSALL MHN, WOODS RL, FOX RM: Unknown primary adenocarcinoma: incidence of overinvestigation and natural history. *Br Med J*, 1979,**1**:1530-1533
69. STRNAD CM, GROSH WW, BAXTER J, BURNETT LS, JONES HW, GRECO FA, HAINSWORTH JD: Peritoneal Carcinomatosis of unknown primary site in women. *Ann Intern Med.* 1989; **111**:213-217
70. TRUE LD a) Epithelial membrane antigens b) Sex steroid hormone receptors. In: Atlas of diagnostic immunohistopathology. Ed. L.D. True, J.B. Lippincott company, 1990, Philadelphia, New York, London
71. WICK MR, LILLEMOR TJ, COPLAND GT ET AL: Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer. Immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Hum Pathol* **20**:281-287, 1989
72. WILLIS RA: The spread of tumours in the human body. 3. Ed. Butterworth & Co, 1973

Anhang

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Guski bedanken, der mir als Betreuer dieser Arbeit mit seiner langjährigen Erfahrung zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. habil. Olaf Kaufmann für die Beratung, die mir den Einstieg ins Thema erleichtert hat, und die mir zur Verfügung gestellte Datenbank mit den immunhistochemischen Färbeargebnissen der hier verwendeten Karzinommetastasen aus dem Routineuntersuchungsmaterial (1992-1998). Ein großes Dankeschön auch an Herrn Steffen Großert, der mit großartigem Engagement die Programmierung des „Tumormarker-Beraters“ vom ersten Entwurf bis zur abschließenden Fassung übernommen hat und immer wieder bereitwillig auf neue Änderungsvorschläge einging.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch Herrn Dr. rer.nat. Peter Hufnagl, der mit seinem Klassifikationsverfahren die Grundlage für den Tumormarker-Berater geliefert hat und der stets mit viel Geduld und Freundlichkeit auf alle meine Fragen und Nöte einging. Ich habe von ihm viel lernen können. Danke.

LEBENS LAUF

Name: Irena Klassen

Geburtstag: 12.11.1966

Geburtsort: Nowosibirsk

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1973-83	Goethe-Oberschule Neuenhagen
1975-83	5. Polytechnische Oberschule Strausberg
1983-85	Erweiterte Oberschule Strausberg
1985	Abitur
1985-86	Medizinisches Vorpraktikum in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Strausberg
1986-92	Studium der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité)
1992-93	Ärztin im Praktikum in der Chirurgischen Klinik des Oskar-Ziethen-Krankenhauses in Berlin
1993-94	Ärztin im Praktikum in der Inneren Abteilung des Forßmann-Krankenhauses Eberswalde
1994-97	Assistenzärztin in der Fachklinik für Herz- und Gefäßkrankheiten in Bad Salzuflen
1997-99	Assistenzärztin in der allgemeinmedizinischen Praxis Dr. Schoening in Bielefeld
1999	Prüfung zum Facharzt für Allgemeinmedizin in Münster
seit Anfang 1999	in eigener Niederlassung als Ärztin für Allgemeinmedizin in Bielefeld

Berlin, den 28.01.01

Irena Klassen

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die Anfertigung erfolgte unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Literatur und Hilfsmittel.